

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALANA MARIELLE RODRIGUES GALDINO



PLASTICIDADE DO DESENVOLVIMENTO MUSCULAR E DA EXPRESSÃO
TEMPORAL DE FATORES REGULADORES MIOGÊNICOS DURANTE OS
ESTÁDIOS INICIAIS DE *Rhamdia quelen* INCUBADOS EM DIFERENTES
TEMPERATURAS



CURITIBA

2013

ALANA MARIELLE RODRIGUES GALDINO

PLASTICIDADE DO DESENVOLVIMENTO MUSCULAR E DA EXPRESSÃO
TEMPORAL DE FATORES REGULADORES MIOGÊNICOS DURANTE OS
ESTÁDIOS INICIAIS DE *Rhamdia quelen* INCUBADOS EM DIFERENTES
TEMPERATURAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flavia Sant'Anna Rios

CURITIBA
2013

FICHA CATALOGRÁFICA


TERMO DE APROVAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR


Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

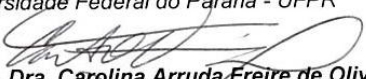
PARECER

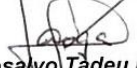
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Profa. Dra. Flávia Sant' Anna Rios
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Luciana Nakaghi Ganeco Kirschnik
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa


Profa. Dra. Sônia Regina Grotzner
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Carolina Arruda Freire de Oliveira
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplentes,

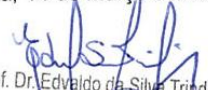
Profa. Dra. Cláudia Feijó Ortolani-Machado
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a candidata **Alana Marielle Rodrigues Galdino**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Plasticidade do desenvolvimento muscular e da expressão temporal de fatores reguladores miogênicos durante os estágios iniciais de *Rhamdia quelen* incubados em diferentes temperatura" são de parecer favorável à Aprovação da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 14 de Março de 2013


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

Dedico este trabalho...

Ao meu querido marido **Everton**, pessoa que escolhi para formar minha família, o grande amor da minha vida, minha companhia, minha força, meu apoio e compreensão sempre.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer o programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, em particular ao coordenador Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade pelo auxílio, compreensão e disposição em todos os momentos.

À minha orientadora Flavia Sant'Anna Rios por acreditar em minha dedicação e força de vontade, além de me oferecer o caminho para uma carreira científica.

À querida Prof. Dr. Célia Regina Cavichiolo Franco pelo auxílio com as análises de imunohistoquímica e glicosaminoglicanos sulfatados. Além disso, pela amizade, ensinamentos e, pela grande atenção.

Aos técnicos de microscopia da UFPR, Alessandra e Israel e ao Prof. Dr. Maurílio José Soares do ICC-PR pelo auxílio com as imagens de microscopia de luz e imunohistoquímica.

A Dra. Lucélia Donatti e ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR pelo auxílio com a microscopia eletrônica de transmissão

Ao Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUC-PR pela concessão dos ovos de jundiá, em especial aos diretores, Peter Gaberz Kirschnik e Ana Paula Baldan e ao técnico César Sary.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e a Dra. Susanne Dietrich pela oportunidade de me receber em seu laboratório.

À querida Beatriz Borges (Bia), pelos ensinamentos, atenção, paciência e boa vontade que teve para comigo ao longo das várias ajudas científicas e, sobretudo, por sua amizade. E aos demais colegas do LIPS (Stelle, Francine, Patrícia, Tabata, Aline e Lucas), pelo auxílio científico e apoio.

A Bruna Aline, pelo auxílio com a morfometria das fibras musculares.

Em especial: a Deus, pois sem ele nada seria possível; à minha mãe Edna Regina, pelo exemplo de vida e amor incondicional; aos meus irmãos, Vinícius e Brisa pelo apoio em todos os momentos e mesmo à distância; e ao grande amor da

minha vida, que me apoiou sempre, viveu comigo todos os prazeres e desprazeres desta etapa da minha vida, que resistiu a ausência enquanto estive no exterior, que desistiu de seus desejos para tornar o meu realidade, Everton.

Às minhas queridas amigas Sarah e Débora, que me ajudaram diariamente a resistir ao estágio no exterior, pela ajuda científica e amizade. Além delas, aos meus amigos Giovana e Márcio que sempre acreditaram mais em mim do que eu mesma.

Às queridas amigas de laboratório: Cíntia, Mariana, Maria Rosa, Nádia e Priscila que me acolheram no meu retorno do exterior, e me ajudaram em vários momentos. Em especial à Tânia que além de ser uma amiga querida, auxiliou nas análises estatísticas deste estudo.

Aos amigos que já não estão mais no laboratório: Camila, Claudemir, Danilo, Fernanda, Marcelo, Anderson e Mônica pelos muitos momentos de diversão e pelos ensinamentos, sejam eles técnicos ou de experiência de vida. Onde todos de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Tecido Muscular – Estrutura e Ultraestrutura..... | 15 |
| 1.2 Tecido Muscular em Peixes Teleósteos..... | 18 |
| 1.3 Miogênese da Fibra Muscular..... | 20 |
| 1.4 Controle da Miogênese..... | 28 |
| 1.5 Controle da Miogênese em Teleósteos..... | 29 |
| 1.6 Matriz Extracelular..... | 33 |
| 1.7 Efeito da Temperatura na Miogênese..... | 37 |
| 1.8 O Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)..... | 40 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 42 |
| 3. OBJETIVOS..... | 44 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 44 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 44 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 45 |
| 4.1 Desova e Fertilização..... | 45 |
| 4.2 Bioensaios e Amostragem..... | 46 |
| 4.3 Estrutura do Tecido Muscular e Morfometria das Fibras Musculares | 48 |
| 4.4 Ultraestrutura das Fibras Musculares..... | 50 |
| 4.5 Imunomarcção das Fibras Musculares..... | 50 |
| 4.6 Glicosaminoglicanos..... | 53 |
| 4.7 Estatística..... | 54 |
| 5. RESULTADOS | 55 |
| 5.1 Estrutura do Tecido Muscular e Morfometria das Fibras Musculares. | 55 |
| 5.2 Ultraestrutura das Fibras Musculares..... | 58 |
| 5.3 Imunomarcção das Fibras Musculares..... | 64 |
| 5.4 Glicosaminoglicanos..... | 69 |
| 6. DISCUSSÃO | 72 |
| 7. CONCLUSÕES | 78 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 79 |
| ANEXO I – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA..... | 93 |
| ANEXO II – PROTOCOLOS UTILIZADOS..... | 94 |
| ANEXO III - ESTADIAMENTO DO JUNDIÁ <i>Rhamdia quelen</i>..... | 100 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Organização do tecido muscular estriado esquelético | 16 |
| FIGURA 2 – Desenho esquemático de uma miofibrila de vertebrado..... | 17 |
| FIGURA 3 – Organização anatômica da musculatura estriada esquelética..... | 18 |
| FIGURA 4 – Diagrama esquemático do arranjo das fibras musculares brancas e vermelhas dentro do miótomo de teleósteos..... | 19 |
| FIGURA 5 – Corte transversal da musculatura estriada esquelética de <i>Danio rerio</i> | 20 |
| FIGURA 6 – Origem embrionária dos músculos do tronco e membros dos vertebrados..... | 21 |
| FIGURA 7 – Miogênese no embrião de zebrafish (<i>Danio rerio</i>)..... | 23 |
| FIGURA 8 – Esquema demonstrativo dos principais eventos durante a embriogênese do músculo estriado esquelético..... | 24 |
| FIGURA 9 – Esquema demonstrativo da estrutura das células satélites..... | 25 |
| FIGURA 10 - Modelo das etapas de desenvolvimento do músculo esquelético | 26 |
| FIGURA 11 – Crescimento muscular por hipertrofia e hiperplasia..... | 28 |
| FIGURA 12 – Modelo descrevendo os principais eventos da miogênese no músculo esquelético de teleósteos..... | 31 |
| FIGURA 13 – Transcrição de um somitômero para um somito | 35 |
| FIGURA 14 – Esquema da estrutura do somito de vertebrado em secção transversal..... | 36 |
| FIGURA 15 – Esquema da estrutura de agregado de proteoglicano..... | 37 |
| FIGURA 16 – Esquema demonstrando o efeito causado pelas modificações ambientais..... | 38 |
| FIGURA 17 – Exemplar adulto de <i>Rhamdia quelen</i> | 40 |
| FIGURA 18 – Procedimento de extrusão de fertilização <i>in vitro</i> em <i>Rhamdia quelen</i> | 45 |
| FIGURA 19 – Bioensaios com diferentes temperaturas de incubação de embriões de <i>Rhamdia quelen</i> | 46 |
| FIGURA 20 – Representação em microscopia de luz de larva em eclosão de jundiá..... | 49 |
| FIGURA 21 – Esquema ilustrativo da morfometria das fibras musculares..... | 50 |
| FIGURA 22 – Esquema ilustrativo da reação imunohistoquímica..... | 51 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 23 – Esquema da molécula de miosina..... | 52 |
| FIGURA 24 – Área muscular em mm ² e número de fibras musculares totais das larvas de jundiá incubados a 21 e 27°C..... | 55 |
| FIGURA 25 – Área das fibras musculares em µm ² e densidade (fibras.mm ⁻²) das larvas de jundiá incubados a 21 e 27°C ao longo dos estádios experimentais (larva 24 hpe, larva 48 hpe e pós-larva 7 dpe)..... | 56 |
| FIGURA 26 - Análise da estrutura muscular sob ML em secção transversal de embriões e larvas de <i>Rhamdia quelen</i> incubados a 21 e 27°C..... | 57 |
| FIGURA 27 - Análise ultraestrutural de secção transversal em MET de músculo de jundiá..... | 59 |
| FIGURA 28 - Eletronmicrografias de transmissão de músculo de jundiá em secção longitudinal..... | 60 |
| FIGURA 29 - Secção transversal sob MET de músculo de jundiá..... | 61 |
| FIGURA 30 - Análise ultraestrutural de músculo de <i>Rhamdia quelen</i> em secção transversal..... | 62 |
| FIGURA 31- Análise ultraestrutural em MET de músculo em secção longitudinal e transversal de embriões e larvas de jundiá incubados a 21 e 27°C..... | 63 |
| FIGURA 32 – Larvas e pós-larvas vivas de jundiá <i>R. quelen</i> | 65 |
| FIGURA 33 - Análise do perfil de marcação de mioblastos do tecido muscular durante o desenvolvimento embrionário e larval de jundiá empregando-se microscopia confocal..... | 66 |
| FIGURA 34 - Análise do perfil de marcação de miosina do tecido muscular durante o desenvolvimento embrionário e larval de jundiá empregando-se microscopia confocal..... | 68 |
| FIGURA 35 - Análise do perfil de marcação de miócitos do tecido muscular durante o desenvolvimento embrionário e larval de jundiá empregando-se microscopia confocal..... | 69 |
| FIGURA 36 – Análise dos Glicosaminoglicanos separados por eletroforese em gel de agarose..... | 70 |
| FIGURA 37 – Quantidade de GAG DS em µg nas larvas e pós-larvas de jundiá incubados a 21 e 27°C..... | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Principais glicosaminoglicanos e suas unidades dissacarídeas repetitivas..... | 36 |
| TABELA 2 – Estádios em que os embriões, larvas e pós-larvas de <i>Rhamdia quelen</i> foram amostrados | 47 |
| TABELA 3 – Número de Bioensaios realizados para este estudo | 48 |
| TABELA 4 – Quadro resumo dos resultados observados neste estudo..... | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS

10S – Embrião com 10 pares de somitos

25S - Embrião com 25 pares de somitos

AH – Ácido Hialurônico

BLV – Borda lateral ventral

BMD – Borda medial dorsal

CS – Condroitin Sulfato

dpe – dias após a eclosão

DS – Dermatan Sulfato

E – Eclosão

GAGs – Glicosaminoglicanos

HE – Hematoxilina-eosina

HMM – Meromiosina pesada

hpe – horas após a eclosão

hpf – Horas após a fertilização

HS – Heparan Sulfato

L24 – Larva 24 horas após eclosão

L48 – Larva 48 horas após eclosão

LMM – Meromiosina leve

MEC – Matriz extracelular

MHC – Cadeia pesada da miosina

MLC – Cadeia leve da miosina

MPC – Célula progenitora miogênica

MRFs – Fatores regulatórios miogênicos

PBS – Tampão fosfato

PDA – 1,3 Diaminopropano acetato

PFA – Paraformaldeído

PL7 - Larva 7 dias após eclosão

QS – Queratan Sulfato

RESUMO

Variações da temperatura de incubação de ovos de peixes podem ter efeitos teratogênicos e causar alterações no crescimento, número e tamanho das fibras musculares, bem como nas propriedades contráteis e metabólicas do músculo. Este estudo teve por objetivo verificar os efeitos da temperatura na expressão de reguladores miogênicos, bem como na diferenciação e no crescimento muscular do jundiá (*Rhamdia quelen*) durante o desenvolvimento inicial. Para tanto, embriões obtidos por fertilização *in vitro* foram incubados em diferentes temperaturas (21°C e 27°C) até o período de pós-larva (7 dias após a eclosão). Através da técnica de imunomarcção, foram analisadas alterações na expressão de dois reguladores miogênicos (MRFs): MyoD e miogenina e também da proteína do citoesqueleto miosina a qual indica diferenciação muscular. Em conjunto, estas moléculas regulam a formação, o crescimento e a diferenciação das fibras musculares. Com o auxílio de técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, bem como de imunomarcção de elementos do citoesqueleto muscular (miosina), foi verificada a formação e organização dos sarcômeros, trazendo informações a respeito do efeito da temperatura na diferenciação celular e correta organização destas estruturas, permitindo que a função contrátil destas células seja mantida. Foi analisado, ainda, se existe relação entre a temperatura de incubação e a ocorrência de crescimento muscular por hipertrofia e por hiperplasia, o que poderia refletir na alteração da celularidade e consequente alteração da qualidade da carne do peixe. Houve diferença na taxa de desenvolvimento das células musculares das pós-larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) entre as temperaturas experimentais (21 e 27°C) através das análises de microscopia de luz e MET, sendo que a 27°C as pós-larvas obtiveram maior área total, menor quantidade de células, porém células mais espessas. O padrão de imunomarcção dos para a MyoD, miogenina e miosina foi similar em todos os estádios experimentais analisados e em ambas as temperaturas. Foi verificada a presença do GAG dermatam sulfato em quantidade maior nas larvas incubadas em temperaturas mais altas.

Palavras-chave: microscopia eletrônica, miogênese, peixes, *Rhamdia quelen*, temperatura

ABSTRACT

Incubation temperature variations of fish embryos may have teratogenic effects and cause changes in growth, number and size of muscle fibers, as well as in contractile and metabolic properties of the muscle. This project aimed to investigate the effects of temperature on the expression of myogenic regulators, as well as in the differentiation and growth of catfish muscle (*Rhamdia quelen*) during early development. Therefore, embryos obtained by *in vitro* fertilization were incubated at different temperatures (21°C and 27°C) until the post-larvae period (7 days after hatching). Through the technique of immunoblotting, we analyzed expression changes in two myogenic regulators factors (MRFs): MyoD and myogenin, and also myosin, a cytoskeletal protein which indicates muscle differentiation. Together, these molecules regulate the formation, growth and differentiation of muscle fibers. With the techniques of light and transmission electron microscopy as well as immunostaining of muscle cytoskeletal elements (myosin), was verified the formation and organization of sarcomeres, bringing information about the effect of temperature on differentiation and correct cellular organization of these structures, allowing the contractile function of these cells is maintained. Were analyzed, even if there were a relationship between incubation temperature and the occurrence of muscle growth by hypertrophy and hyperplasia, which could reflect changes in cellularity and by consequence alteration of fish flesh quality. Were no difference in the muscle development rate of silver catfish post-larvae between the experimental temperatures (21 and 27°C) by light microscopy and TEM analysis, and at 27°C the post-larvae has obtained a higher total area, fewer cells, but thicker cells. The immunostaining pattern of myoblasts was similar in all experimental stages and analyzed at both temperatures. The pattern of immunostaining for MyoD, myogenin and myosin was similar in all experimental stages and analyzed at both temperatures. The occurrence of GAG dermatan sulfate in larger quantity in the larvae incubated at higher temperatures.

Key words: fish, electron microscopy, myogenesis, *Rhamdia quelen*, temperature

1INTRODUÇÃO

1.1 TECIDO MUSCULAR- ESTRUTURA E ULTRA-ESTRUTURA

O tecido muscular é um dos quatro tecidos básicos e é responsável pelos movimentos corporais. É composto por células alongadas, denominadas **células musculares, miofibras ou fibras musculares**, que contém grande quantidade de filamentos citoplasmáticos altamente organizados e são responsáveis pela contração muscular. Este tecido pode ser classificado em: liso, estriado esquelético e estriado cardíaco, conforme sua morfologia e função. Embora esta organização tenha sido detalhadamente descrita anteriormente por Huxley (1969; 1971; 1983), Onofre-Oliveira (2009) descreve-o de modo bastante claro.

A musculatura estriada dos vertebrados apresenta uma aparência listrada ao ser observada sob microscopia de luz convencional, uma vez que são formados por feixes de fibras musculares longas, cilíndricas e multinucleadas, os **miotubos**, com diâmetro que varia de 10 a 100µm e um comprimento que pode chegar a vários centímetros. Essas fibras são formadas no embrião pela fusão **entre mioblastos** (precursor da fibra), que produzem um sincício multinucleado pós-mitótico de células musculares (ONOFRE-OLIVEIRA, 2009). Tais fibras se agrupam em feixes circundados por bainhas de tecido conjuntivo que são denominadas: **epimísio** (camada de tecido conjuntivo denso que envolve o músculo inteiro), o **perimísio** (deriva do epimísio e envolve os feixes ou fascículos de células musculares) e o **endomísio** que é uma delicada camada de fibras reticulares e matriz extracelular (envolve cada célula muscular) conforme esquematizado na Fig. 1. Vasos sanguíneos e nervos utilizam essas bainhas de tecido conjuntivo para alcançar o interior da massa muscular (KIERSENBAUM, 2008).

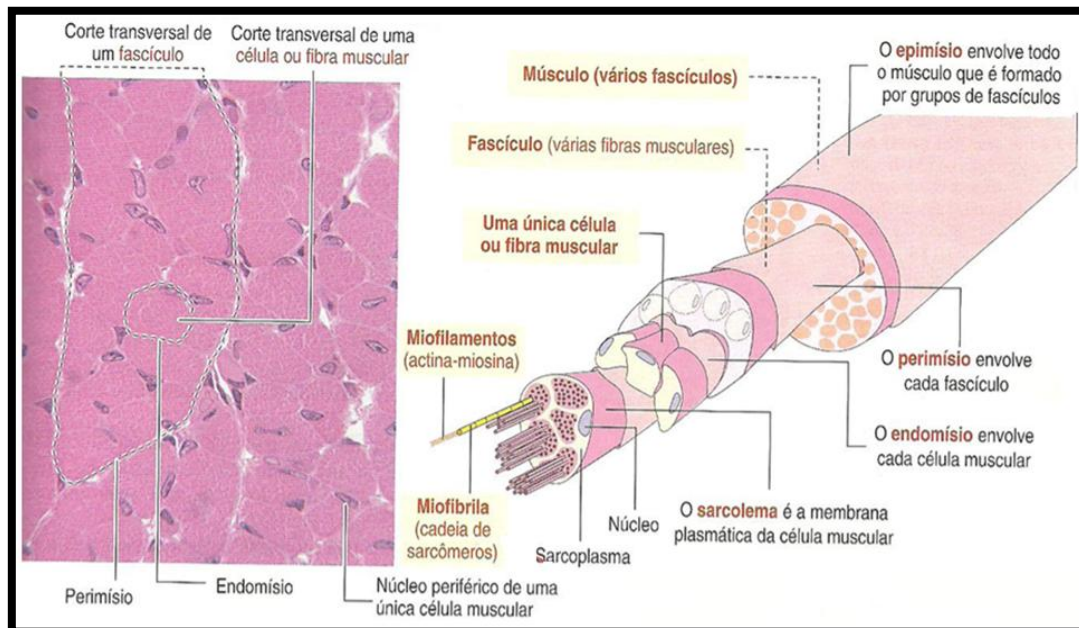


FIGURA 1 – Organização do tecido muscular estriado esquelético. Ao lado esquerdo da FIGURA, corte transversal de músculo corado com H.E., evidenciando a célula ou fibra muscular com perimísio, endomísio e núcleos periféricos. Ao lado direito, esquema mostrando a organização estrutural do músculo, onde observam-se o epimísio, os fascículos, o perimísio, a fibra muscular, o endomísio, o sarcolema, os miofilamentos, o sarcoplasma e a miofibrila. FONTE: Kierszenbaum, (2008).

As **miofibrilas**, de diâmetro de 1 a 2 μ m, dispõem-se longitudinalmente no **sarcoplasma** (citoplasma da célula muscular) ao maior eixo da fibra muscular e apresentam repetições de unidades iguais, os **sarcômeros**, que são as unidades contráteis básicas do músculo estriado. Cada sarcômero é formado principalmente por miofilamentos de actina (finos) e miosina (grossos), além de outras proteínas, tais como: troponina e tropomiosina, dispostos longitudinalmente, em uma organização simétrica e paralela e responsáveis pela contração muscular (ONOFRE-OLIVEIRA, 2009). A **actina F**, o filamento fino do sarcômero, consiste em duas cadeias torcidas uma sobre a outra. A actina F é composta de monômeros globulares (**actina G**). Os monômeros de actina G ligam-se uma ao outro de uma maneira cabeça-cauda, conferindo polaridade ao filamento, com uma extremidade farpada (mais) e uma extremidade ponteaguda (menos). A extremidade farpada dos filamentos de actina insere-se no disco Z. A **miosina**, o principal componente do miofilamento grosso, tem atividade de adenosina-trifosfatase (ATPase) (ou seja, ela hidrolisa ATP) e liga-se de modo reversível à actina F, o principal componente do miofilamento delgado (KIERSZENBAUM, 2008). Na contração muscular ocorre o deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos grossos (HUXLEY, 1969; 1971; 1983). As faixas mais extremas do sarcômero

(claras) são denominadas **banda I** e contém filamentos de actina. A faixa central mais escura é a **banda A**. As extremidades da banda A são formadas por filamentos de actina e miosina sobrepostos, enquanto sua região mediana mais clara (a **banda H**) contém miosina (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008) (Fig. 2). Na linha média da banda H está a **linha M**. O **disco Z** forma um suporte transversal para os sarcômeros, o que assegura a transmissão eficiente da força gerada (KIERSZENBAUM, 2008). O sistema de túbulos transversais ou **sistema T** permite que a despolarização venha desencadear a contração uniforme de cada fibra muscular esquelética. É constituído por uma rede de invaginações tubulares do sarcolema, e suas ramificações envolverão as junções das bandas A e I de cada sarcômero. Justaposto a cada túbulo T existe uma expansão do retículo sarcoplasmático. O túbulo T juntamente com as duas expansões do retículo sarcoplasmático, denomina-se tríade. Na tríade, a despolarização dos túbulos T, derivados do sarcolema, é transmitida ao retículo sarcoplasmático (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

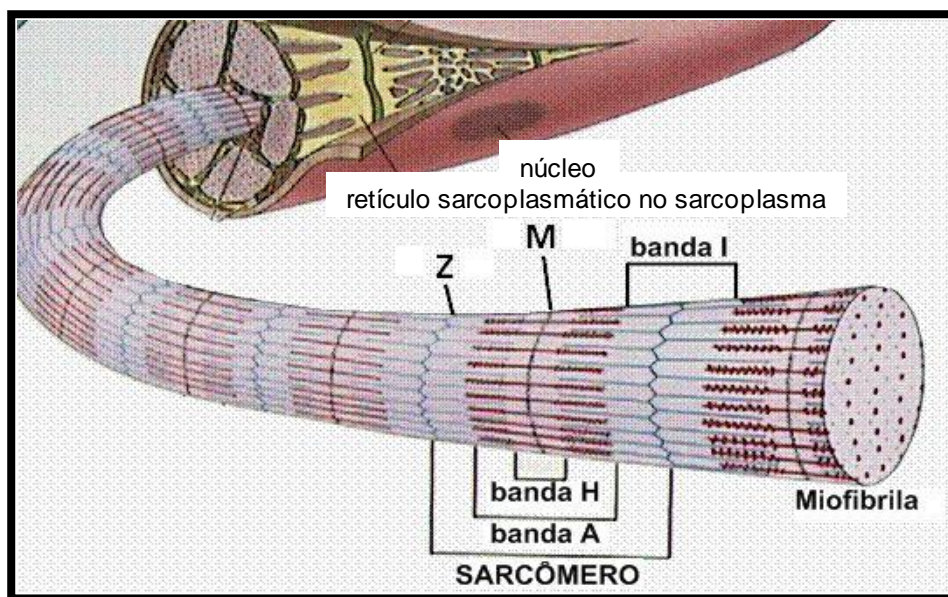


FIGURA 2 - Desenho esquemático de uma miofibrila de vertebrado. Principais componentes: filamentos espessos de actina (Z); filamentos finos de miosina (M); banda I (faixas mais extremas e claras do sarcômero); banda A (faixa central mais escura); Banda H (parte mediana do sarcômero, que possui filamentos de miosina). FONTE: adaptado de Life Sciences (2010).

1.2 TECIDO MUSCULAR EM PEIXES TELEÓSTEOS

A musculatura estriada dos peixes teleósteos compreende uma grande parte da massa corporal (cerca de 60% da massa total do corpo). Nestes organismos aquáticos, os fortes músculos estão organizados em unidades morfofuncionais, os **miômeros**, que se repetem ao longo do corpo do animal separados por bainhas de tecido conjuntivo, os **miosseptos**, onde estão inseridas as fibras musculares (ALEXANDER, 1969) (Fig. 3A).

Os músculos axiais, que flexionam a coluna vertebral e a região caudal de um lado para o outro, durante a natação, estão divididos em porção **epaxial** (dorsal) e **hipoaxial** (ventral) por meio do septo lateral ou transverso (horizontal), localizado na região do nervo da linha lateral (ALEXANDER, 1969; VIDELER, 2011). Além disso, a coluna vertebral é flexível e suporta um septo medial que divide o corpo em **antímeros** direito e esquerdo (VIDELER, 2011) (Fig. 3B).

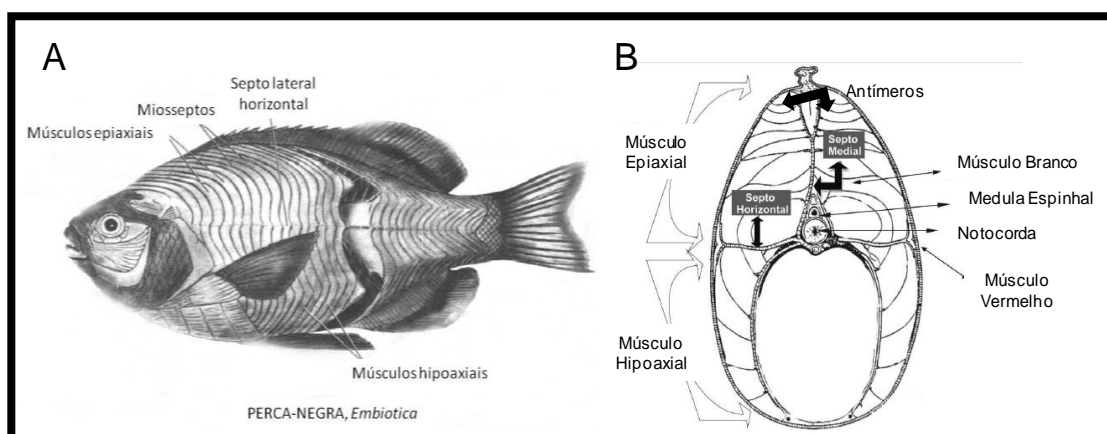


FIGURA 3 - Organização anatômica da musculatura estriada esquelética. (A) Indicando organização periférica, setas indicam: miosseptos (tecido conjuntivo entre os miômeros), septo lateral horizontal ou septo transverso (divide a musculatura epaxial e hipoaxial) e (B) Desenho esquemático de um corte transversal da musculatura de peixe mostrando a organização anatômica interna da musculatura estriada. Observa-se o septo horizontal, o septo medial separando a musculatura em dois antímeros (direito e esquerdo), músculo vermelho (superficial) e branco (profundo). FONTE: A) adaptado de Johnston (2001) B) adaptado de Mareco (2012).

Assim como nos demais vertebrados, existem três tipos básicos de fibras musculares em peixes, as **vermelhas**, as **brancas** e as **intermediárias** (JOHNSTON, 1981). A organização encontrada em peixes elasmobrânquios e teleósteos é a seguinte: os músculos axiais (que flexionam a coluna vertebral e a cauda de um lado para o outro durante a natação) consistem principalmente de fibras brancas-rápidas, cobertas por uma fina camada de fibras musculares

vermelhas-lentas (Fig. 4), e de uma camada de fibras rosa, ou intermediárias, entre elas (SANTOS, 2007).

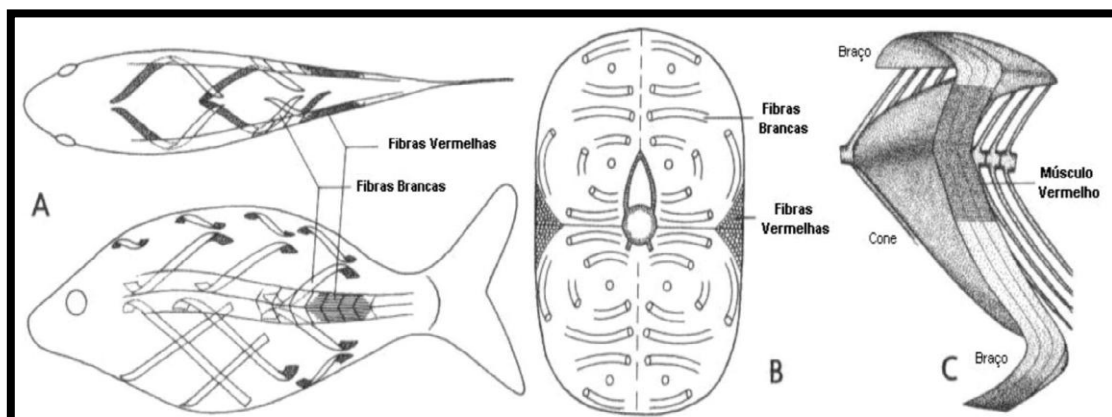


FIGURA 4 - Diagrama esquemático do arranjo das fibras musculares brancas e vermelhas dentro do miótomo de teleósteos: (A) vistas dorsal e lateral, (B) seção transversal, (C) vista lateral de três miótomos da região central do corpo de salmão-rei, *Oncorhynchus tshawytscha*. A forma de W dos segmentos musculares de teleósteos consiste de um cone central e dois braços. FONTE: adaptado a partir de Sängner e Stoiber (2001).

A cor do músculo, em parte, indica o grau de vascularização de cada tipo de fibra. As fibras musculares vermelhas (metabolismo oxidativo) normalmente são menores, apresentam alta concentração de mioglobina, muitas mitocôndrias, lipídios e excelente suprimento sanguíneo, sendo utilizada na realização de movimentos lentos e de sustentação, como a natação durante a migração (DRIEDZIC e HOCHACHKA, 1976; JOHNSTON, 1980; JOHNSTON 1999, SANTOS, 2007). As fibras musculares brancas (metabolismo glicolítico) são maiores, apresentam baixa concentração de mioglobina, poucas mitocôndrias e lipídios, com as miofibrilas ocupando entre 75 a 95% do volume total da fibra (SÄNGER et al., 1990; SÄNGER, 1992; SANTOS, 2007). Entre as fibras vermelha e branca, encontra-se o as fibras intermediárias que apresentam propriedades morfofisiológicas intermediárias em relação às das brancas e vermelhas e apresentam contração rápida com metabolismo oxidativo/glicolítico (SÄNGER e STOIBER 2001) (Fig. 5).

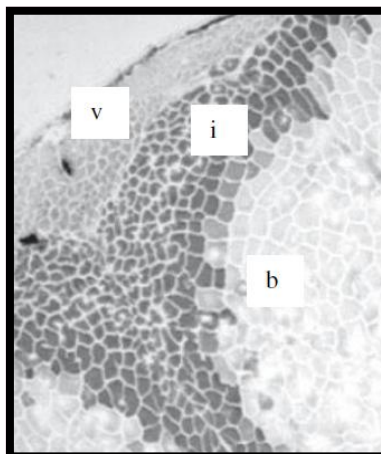


FIGURA 5 – Corte transversal da musculatura estriada esquelética de *Danio rerio*. Reação histoquímica da ATPase miofibrilar, após pré incubação em pH intermediário demonstrando os compartimentos musculares vermelho (v), intermediário (i) e branco (b). FONTE: adaptado de Biga e Goetz (2006).

1.3 MIOGÊNESE DA FIBRA MUSCULAR

O processo de diferenciação das células precursoras musculares (mioblastos) em células do músculo esquelético é denominado de **miogênese** e resulta da ativação coordenada de múltiplos mecanismos de sinalização (ENGEL e FRANZINI-ARMSTRONG, 1994). As primeiras fibras musculares são formadas nas fases iniciais da embriogênese. A miogênese ocorre não apenas para a formação, mas também para o crescimento, manutenção e reparo das fibras musculares (PARKER et al., 2003). O desenvolvimento dos peixes teleósteos, no início da embriogênese, recebe a influência de fatores maternos presentes no ovócito desde a ovogênese (JOHNSTON et al., 2011). A ativação dos ovócitos ocorre após a fertilização, desencadeando uma cascata de eventos necessários para o desenvolvimento do embrião, através da tradução de RNAs maternos e a ativação de proteínas maternas presentes no ovócito, os quais são posteriormente degradados. No estágio de blástula média é que se inicia a transcrição dos genes no embrião (PELEGRI, 2004).

Os embriões de peixe apresentam envoltório translúcido o que permite que os padrões de formação e diferenciação dos somitos, os quais originarão a musculatura, sejam facilmente observados (MARECO, 2012).

O tecido muscular estriado esquelético origina-se a partir do **mesoderma paraxial**, localizado adjacente à notocorda e ao tubo neural em formação. O mesoderma paraxial segmenta-se na direção rostro-caudal do embrião,

formando os somitos (KIMMEL et al., 1990). Os somitos do embrião de vertebrados dão origem a estruturas axiais importantes, como as células cartilaginosas dos moldes das vértebras e das costelas, todos os músculos esqueléticos, incluindo aqueles dos membros, bem como a derme (WOLPERT et al., 2000). Cada somito é formado por uma porção ventral, o **esclerótomo**, que dará origem a estruturas esqueléticas, e uma dorsal, o **dermomiótomo**, que formará a derme e a musculatura do tronco e da cauda (CURRIE e INGHAM, 2001) (Fig.6). Posteriormente, o dermomiótomo se divide em **dermátomo e miótomo** (WOLPERT et al., 2000).

Nos peixes, o esclerótomo é altamente reduzido, pois, no ambiente aquático, o animal apresenta maior facilidade em sustentar o peso do corpo, diminuindo a necessidade de formação de estruturas esqueléticas. Dessa forma, a maior parte do somito é constituída pelo miótomo (BONE, 1966).

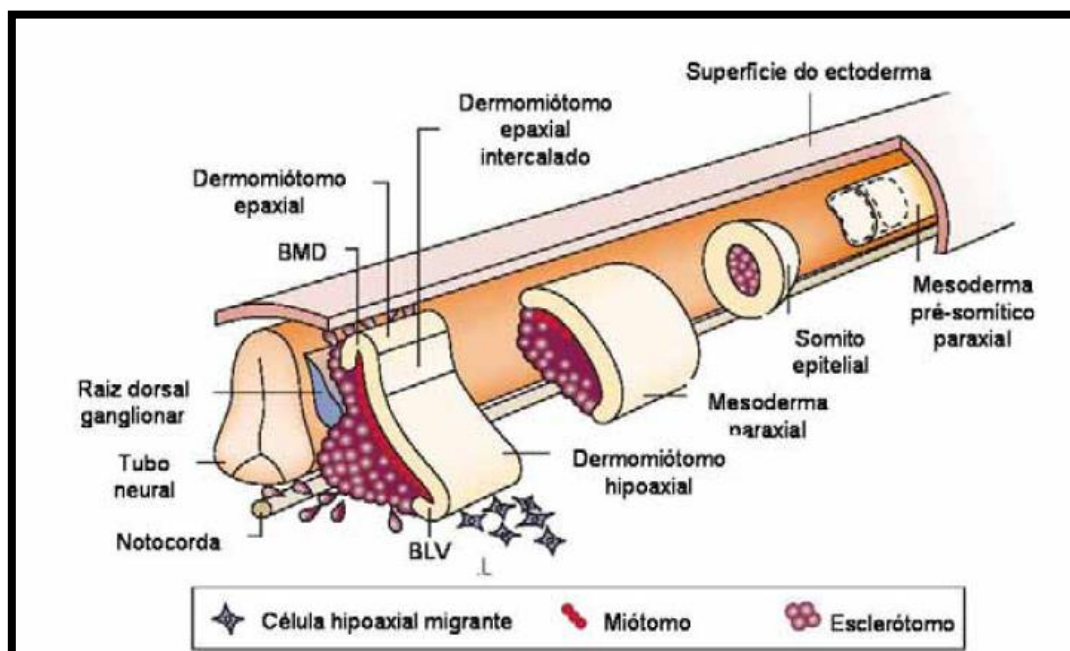


FIGURA 6 - Origem embrionária dos músculos do tronco e dos membros dos vertebrados. O mesoderma paraxial pré-somítico está localizado em cada lado da notocorda. A segmentação do mesoderma paraxial em somitos ocorre ao longo do eixo dorso-ventral e em uma direção céfalo-caudal do embrião. Em resposta a sinais da notocorda e do tubo neural, os somitos se diferenciam e subdividem-se para originar o dermomiótomo e o esclerótomo. Células da borda medial dorsal (BMD) do dermomiótomo migram profundamente do dermomiótomo para formar o dermomiótomo epaxial. Um evento semelhante ocorre na borda lateral ventral (BLV) do dermomiótomo, para a formação do dermomiótomo hipoaxial. Neste esquema, a região mais à direita da figura é a região posterior ou caudal, por isso os somitos representados apresentam aspectos diferentes. FONTE: adaptado de Parker e colaboradores (2003).

Nos somitos, há uma população de células mesodérmicas, as quais dispõem-se em uma única camada que flanqueia ambos os lados da notocorda. Essas células se diferenciam das demais pela morfologia e padrão de expressão gênica, sendo denominadas células adaxiais, precursoras das

células musculares ou **mioblastos lentos**, que formarão as fibras vermelhas (Fig. 7) (CURRIE e INGHAM, 2001; JOHNSTON e HALL, 2004). Sob o estímulo de glicoproteínas secretadas pela notocorda e pelo tubo neural (BLAGDEN et al., 1997), essas células sofrem alongamento e migram em direção à superfície do miótomo (Fig. 7).

As células adaxiais fundem-se umas às outras, formando **miotubos** que se diferenciam em fibras musculares vermelhas, originando a musculatura vermelha do embrião. Uma subpopulação de células adaxiais, denominadas células adaxiais pioneiras, emitem processos citoplasmáticos que as mantêm conectadas à notocorda, possivelmente para orientar a migração das demais células adaxiais em direção à superfície do miótomo (Fig. 7). Nessa região medial, forma-se uma estrutura especializada, o miossepto horizontal, que divide o miótomo nas regiões ventral (hipoaxial) e dorsal (epaxial) (Fig. 7) (DEVOTO et al., 1996).

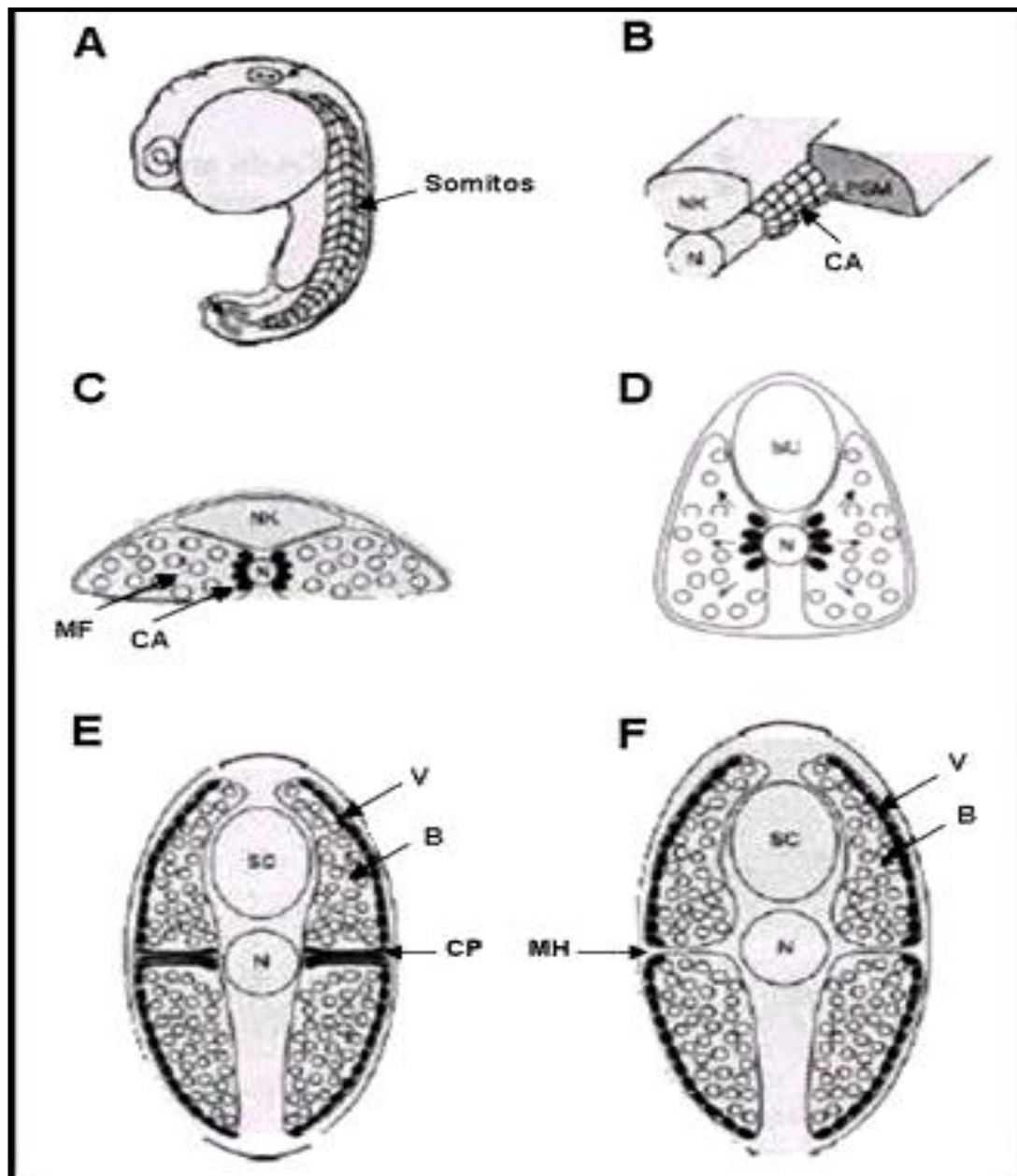


FIGURA 7 - Miogênese no embrião de zebrafish (*Danio rerio*). (A) Embrião com 21 somitos, (B) células adaxiais (CA) adjacentes à notocorda (N), (C) corte transversal do embrião ilustrado em (B). MF: mioblastos rápidos e (D) Células adaxiais alongam-se e migram em direção à superfície do miótomo. (E) Células adaxiais formando o compartimento de músculo vermelho (V). Células pioneiras (CP) mantêm-se conectadas à notocorda, na região do futuro miossepto horizontal (MH). As demais células do miótomo (MF) se diferenciam em fibras musculares brancas (B). (F) Final da miogênese, mostrando uma monocamada superficial de fibras vermelhas (V) circundando uma grande quantidade de fibras brancas (B). FONTE: adaptado de Johnston e Hall (2004).

As demais células do miótomo (mioblastos rápidos) também fundem-se para formar miotubos, dando origem ao compartimento de músculo branco do embrião (CURRIE e INGHAM, 2001; JOHNSTON e HALL, 2004).

Os **mioblastos** (mononucleados) fundem-se uns aos outros, formando **miotubos**. Esses miotubos possuem um ou mais núcleos em posição central, miofibrilas em posição periférica e características morfológicas e fisiológicas

próprias (JOHNSTON, VIEIRA e ABERCROMBY, 1995; JOHNSTON, 1999). Nos miotubos, ocorre a organização das proteínas que irão constituir a unidade contrátil já citada anteriormente, o **sarcômero** (HUXLEY, 1969). Durante a diferenciação dos miotubos, ocorre a organização dos sarcômeros da periferia em direção ao centro do miotubo, enquanto os núcleos migram do centro para a periferia e as miofibrilas passam a ocupar quase todo o **sarcoplasma** (SÄNGER et al., 1990; SÄNGER, 1992) (Fig. 8). Paralelamente, ocorre o desenvolvimento do sistema de membranas constituído por **túbulos T** e retículo sarcoplasmático, ambos envolvidos no processo de contração muscular (SCHIAFFINO e MARGRETH, 1969; FUTCHER et al., 1992). Ao final desses processos, o miotubo passa a ser chamado de **fibra muscular adulta**. Assim, durante a miogênese no embrião, os mioblastos proliferam, migram, diferenciam e fundem-se para formar miotubos e, posteriormente, fibras musculares (Fig. 8).

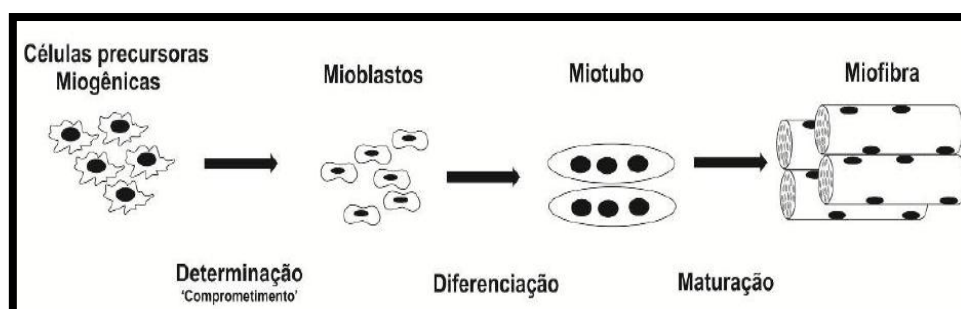


FIGURA 8 – Esquema demonstrativo dos principais eventos durante a embriogênese do músculo estriado esquelético. As células precursoras miogênicas são induzidas a seguir o destino miogênico, ou seja, de formarem células musculares. Para tanto, tornam-se mioblastos que sofrem diferenciação em miotubos e posteriormente passam por uma fase de maturação que levam a formação das miofibrilas compostas por miofibrilas. FONTE: adaptado de Watabe (1999).

No entanto, alguns mioblastos, as **células satélites** (miossatélites), mantêm-se como células tronco no tecido adulto e são responsáveis pelo crescimento muscular pós-embrionário na maioria dos peixes através da ativação, proliferação e diferenciação (MARECO, 2012). Essas células permanecem relativamente indiferenciadas (SNOW, 1986), mas quando ativadas, passam a expressar vários hormônios e fatores de crescimento entre eles, os fatores reguladores miogênicos MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 (HOLTERMAN e RUDNICKI, 2005) que utilizam diversas vias de sinalização, controlando a proliferação e a diferenciação celular (MARECO, 2012) (Fig. 9). É importante salientar que as células satélites, apesar de serem indiferenciadas

e preservarem a sua capacidade proliferativa, são células comprometidas da linhagem miogênica (determinadas). No músculo pós-natal, as células satélites encontram-se entre a lâmina basal e a membrana plasmática da fibra muscular, e apresentam como características núcleo heterocromático, citoplasma espesso com poucas organelas e ausência de miofilamentos (KIERSZENBAUM, 2008) conforme esquematizado na Fig.9.

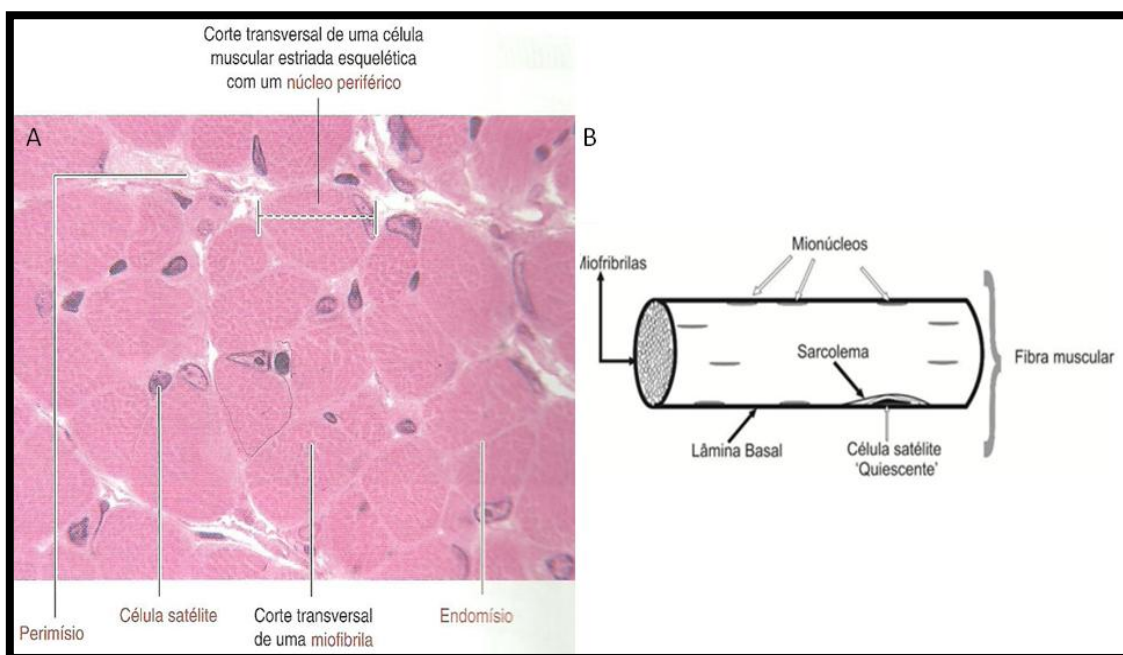


FIGURA 9– Esquema demonstrativo da estrutura das células satélites. A) Corte transversal de músculo evidenciando a célula satélite e B) esquema mostrando disposição longitudinal da desta célula na fibra muscular (elas se encontram entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular). FONTE: adaptado de Kierszenbaum (2008) e Mareco (2012) baseado em Mauro e Adams (1961).

Em resumo, sinais específicos levam os mioblastos a saírem do ciclo celular, e darem início à etapa de diferenciação, através da síntese de proteínas músculo-específicas. Por fim, os mioblastos diferenciados se fundem formando miotubos multinucleados, os quais darão origem às fibras musculares (Fig. 10) (REHFELDT et al., 2000).

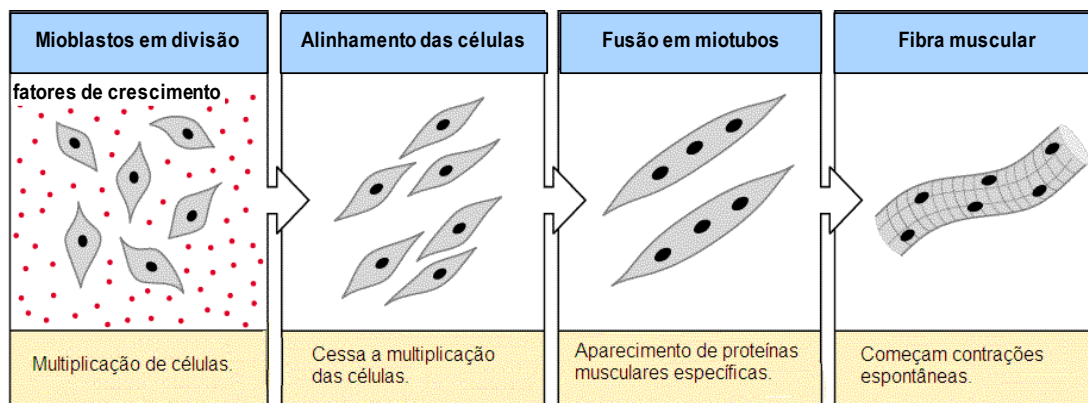


FIGURA 10 - Modelo das etapas de desenvolvimento do músculo esquelético. Primeiramente ocorre a multiplicação celular mediada por fatores de crescimento; na ausência de fatores de crescimento, as células começam a se alinhar e cessa a multiplicação; após esta etapa as células se fundem em miotubos e a fibra muscular finalmente se forma e apresenta contração espontânea. FONTE: Adaptado de Wolpert (2000).

Johnston e colaboradores (1998) descreveram que durante a formação da musculatura miotomal podem ser reconhecidas três fases distintas em algumas espécies de peixes. Como mencionado anteriormente, estas são iniciadas no embrião como resultado de uma intrincada rede de sinais provenientes de estruturas adjacentes, as quais especificam o destino miogênico de células precursoras musculares (BUCKINGHAN, 2001).

Na primeira fase, ocorre a formação das fibras musculares embrionárias a partir de mioblastos que surgiram antes da eclosão. Nesta fase há um aumento na área ocupada por tecido muscular. Na segunda fase da miogênese, observada na fase larval, ocorre a proliferação dos mioblastos com o aparecimento das zonas germinais ou zonas de proliferação de mioblastos, localizadas na extremidade apical da região dorsal (epaxial) e na região ventral (hipoaxial) dos miótomos. Já na terceira fase da miogênese, observada nas fases de crescimento juvenis ou adultas, ocorre à ativação de mioblastos adultos ou células mio-satélites localizadas no tecido conjuntivo, entre as fibras musculares diferenciadas ou entre a lâmina basal e a membrana plasmática da fibra muscular (VEGETTI et al., 1990). Nesse caso, observam-se fibras grandes e pequenas (aspecto em mosaico das fibras, quanto ao diâmetro) principalmente na musculatura branca (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001).

A maioria dos peixes, diferentemente dos mamíferos, apresenta um crescimento contínuo ao longo da vida, ocorrendo através de dois processos chamados de hiperplasia e hipertrofia (GREER-WALTER e PULL, 1970; MARECO, 2012). Nas espécies menores (que atingem poucos centímetros de comprimento), o crescimento muscular envolve principalmente a hipertrofia de

fibras formadas nas fases iniciais da embriogênese e o período de crescimento hiperplásico é mais curto. Nas espécies que atingem um tamanho maior, novas fibras musculares são continuamente recrutadas em todas as fases do crescimento, inclusive na vida adulta (WEATHERLEY et al., 1988; ALAMI-DURANTE et al., 1997; ROWLERSON e VEGGETTI, 2001). Estes processos contribuem por todo o período de crescimento pós-embrionário da musculatura estriada (MARECO, 2012). Adiciona-se a isto, que mesmo nos animais adultos, as fibras musculares esqueléticas não são estruturas estáticas, pois são capazes de alterar suas propriedades contráteis e metabólicas (GOLDSPINK, 1985).

Na hipertrofia, as células mio-satélites fundem-se com fibras musculares existentes, aumentando o número de núcleos e a síntese de miofibrilas, levando ao aumento no diâmetro ou área da fibra muscular (JOHNSTON, 1999; ROWLERSON e VEGGETTI, 2001) (Fig. 11). As fibras musculares crescem por hipertrofia durante todo o período de crescimento pós-larval até atingirem um diâmetro máximo que é em torno de 100µm (fibras brancas) (MARECO, 2012).

A hiperplasia em mosaico resulta em um grande aumento no número de fibras musculares, devido à formação de novas fibras (JOHNSTON, 2004), principalmente na fase juvenil, podendo ser facilmente observada na musculatura das espécies que atingem um tamanho maior (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001) (Fig. 11). Quando a hiperplasia em mosaico está ocorrendo, observam-se fibras pequenas (diâmetro menor que 25µm) entre fibras maiores, formando um mosaico de fibras de diferentes tamanhos e estágios de diferenciação, sendo melhor observado na musculatura branca (JOHNSTON, 1999; ROWLERSON e VEGGETTI, 2001). Neste tipo de crescimento, ocorre a produção de miotubos e novas fibras musculares até que o peixe alcance aproximadamente 40% do comprimento máximo do corpo (JOHNSTON, 2004).

Martinez e colaboradores (2000) sugeriram que, em algumas espécies, o músculo intermediário também contribui ativamente para o crescimento hiperplásico de músculos vermelhos e brancos ou de ambos.

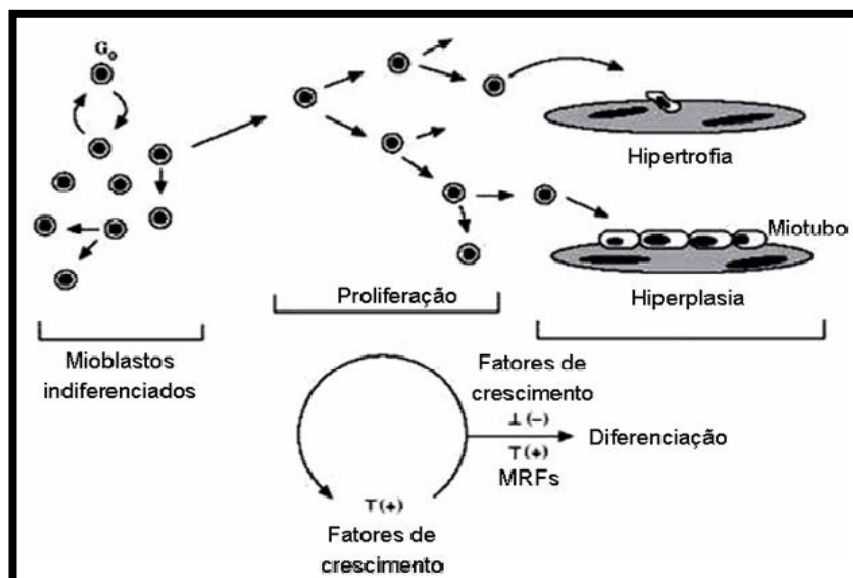


FIGURA 11 – Crescimento muscular por hipertrofia e hiperplasia. Na hipertrofia, núcleos de alguns mioblastos indiferenciados (células miossatélite) são incorporados em uma fibra muscular existente. Na hiperplasia, outros mioblastos podem se fundir na superfície da fibra muscular, formando uma nova fibra. Estas vias são controladas por fatores de crescimento. FONTE: adaptado de Johnston (1999).

O balanço entre os crescimentos hipertrófico e hiperplásico irá determinar a taxa de crescimento e o tamanho final da espécie. Contudo, este processo é dependente de vários fatores como, temperatura, fotoperíodo, regime alimentar e composição da dieta, tipo de músculo, espécie e fase de crescimento (JOHNSTON et al., 2001; DAL PAI-SILVA et al., 2003a; DAL PAI-SILVA et al., 2003b; ASSIS et al., 2004; AGUIAR et al., 2005).

1.4 CONTROLE DA MIOGÊNESE

Como mencionado anteriormente, a diferenciação das células musculares a partir da mesoderme está sob controle de complexas vias de sinalização dos tecidos vizinhos, particularmente da notocorda e da ectoderme, induzindo a expressão de fatores de regulação miogênicos (MRFs) pelas células precursoras musculares (MOLKENTIN e OLSON, 1996). Nos estádios iniciais do desenvolvimento, as células precursoras miogênicas são amplamente distribuídas no miótomo (VEGGETTI et al., 1990; STOIBER e SANGER, 1996; JOHNSTON et al., 1998, 2001). Estas células podem fundir-se umas às outras formando novas fibras (**hiperplasia**), ou ainda podem proliferar e fundir-se às fibras preexistentes, aumentando sua espessura (**hipertrofia**) (JOHNSTON et al., 1998; JOHNSTON, 2001; ASSIS et al., 2004).

Como o crescimento muscular de peixes difere dos mamíferos devido ao recrutamento contínuo de células ao longo da vida (GREER-WALKER e PULL, 1970; STICKLAND, 1983), no processo pós-embrionário do tecido muscular dos peixes há tanto hipertrofia quanto hiperplasia (KOUUMANS e AKSTER, 1995; ALAMI-DURANTE et al., 1997; GALLOWAY et al., 1999 a, b; ROWLERSON e VEGGETTI, 2001; DAL PAI et al., 2002; ASSIS et al., 2004). Os teleósteos produzem novos miotúbulos ao longo de todos os estádios de vida (larval, juvenil e adulto) (MACQUEEN et al., 2007). Este padrão de crescimento muscular peculiar dos peixes está associado à contínua expressão do **Fator de Crescimento de Fibroblastos-6** (FGF-6) (RESCAN, 1998). O recrutamento de novas fibras é particularmente importante em espécies que atingem grandes tamanhos e o número de células musculares acrescentadas para atingir uma determinada espessura varia entre as famílias e linhagens de peixes, sendo também influenciado por fatores ambientais, como a temperatura (JOHNSTON, 1999; 2006).

1.5 CONTROLE DA MIOGÊNESE EM TELEÓSTEOS

O estudo da expressão temporal dos genes que controlam o desenvolvimento muscular nos estádios iniciais de peixes é de grande interesse tanto para a biologia do desenvolvimento, quanto para o setor produtivo. Johnston (2006) resumiu os principais eventos envolvidos na formação e crescimento muscular de teleósteos, conforme representado na Fig. 12 e descrito a seguir.

Células tronco pluripotentes dos somitos se tornam mioblastos, que estão comprometidos com um destino miogênico, formando uma população de células progenitoras miogênicas (Myogenic Progenitor Cell, **MPC**). As MPCs dos peixes são equivalentes às células satélite dos mamíferos (MCCROSKERY et al., 2003). Este comprometimento envolve principalmente a expressão dos fatores regulatórios miogênicos (Myogenic regulatory factors, MRFs) denominados **myoD** (fator determinante de mioblastos), **myf-5** (JOHNSTON, 2006), **miogenina** e **MRF4** (WATABE, 1999, 2001; WEINTRAUB, 1993). Os MRFs são potentes ativadores transcricionais de genes músculo-específicos, tendo dois domínios conservados em cada membro da família: a região básica

e o domínio HLH (hélice-alça-hélice) que apresenta 80% de similaridade na sua sequência de aminoácidos uns com os outros (EDMONDSON e OLSON, 1993; WEINTRAUB et al., 1991). A região HLH é composta por duas α -hélices separadas por uma alça (*loop*), enquanto que a região básica (*basic*) caracteriza-se pela extensão de uma das α -hélices da região HLH (COLE et al., 2004). Há uma sequência no DNA chamada E-box (5'-CANNTG-3') localizada na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos, a qual é reconhecida pelos MRFs, através do seu domínio básico (BLACKWELL e WEINTRAUB 1990; LASSAR et al., 1989; MURRE et al., 1989). Por outro lado, a região HLH dos MRFs é responsável pela ligação dessa molécula com proteínas E, como E12 e E47 (MURRE et al., 1989), resultando em heterodímeros "MRFs/proteína E". A ligação entre heterodímero ou de homodímeros dos "MRFs/MRFs" e a sequência E-box ativa a transcrição de genes músculo-específicos, levando à sua expressão (LASSAR et al., 1989; MURRE et al., 1989). Estes fatores autorregulam sua própria expressão e ativam uns aos outros para estabilizar a diferenciação muscular (OLSON, 1992).

Durante a miogênese, os MRFs **MyoD** e **myf5**, são conhecidos como fatores primários que determinam a proliferação dos mioblastos ou das células satélites, enquanto a expressão da **miogenina** e **MRF4**, os fatores secundários, determinam o processo de diferenciação dos mioblastos, nas fases de fusão e diferenciação em fibras musculares maduras, ou das células satélites (RESCAN, 2001; WATABE 1999, 2001) (Fig.12). Além disso, a expressão de proteínas da família **MyoD** pode afetar o número de fibras musculares formadas, uma vez que ocorre heterocronicidade na expressão de seus membros (MACQUEEN et al., 2007). Até recentemente, eram conhecidos apenas dois parálogos do MyoD, porém, recentemente o terceiro parálogo deste fator foi caracterizado no salmão do atlântico (*Salmo salar* L.), na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e na truta marrom (*Salmo trutta*). Análises filogenéticas demonstraram que cada parálogo do MyoD de salmonídeos era ortólogo para um gene universal MyoD de teleósteos, denominado de MyoD1, e distinto de um segundo parálogo do MyoD, chamado de MyoD2, encontrado somente em algumas espécies de peixes. Os três parálogos do MyoD1 foram chamados de MyoD1a, b, c e têm seus padrões de expressão durante o

desenvolvimento embrionário diferenciados uns dos outros (MACQUEEN e JOHNSTON, 2006).

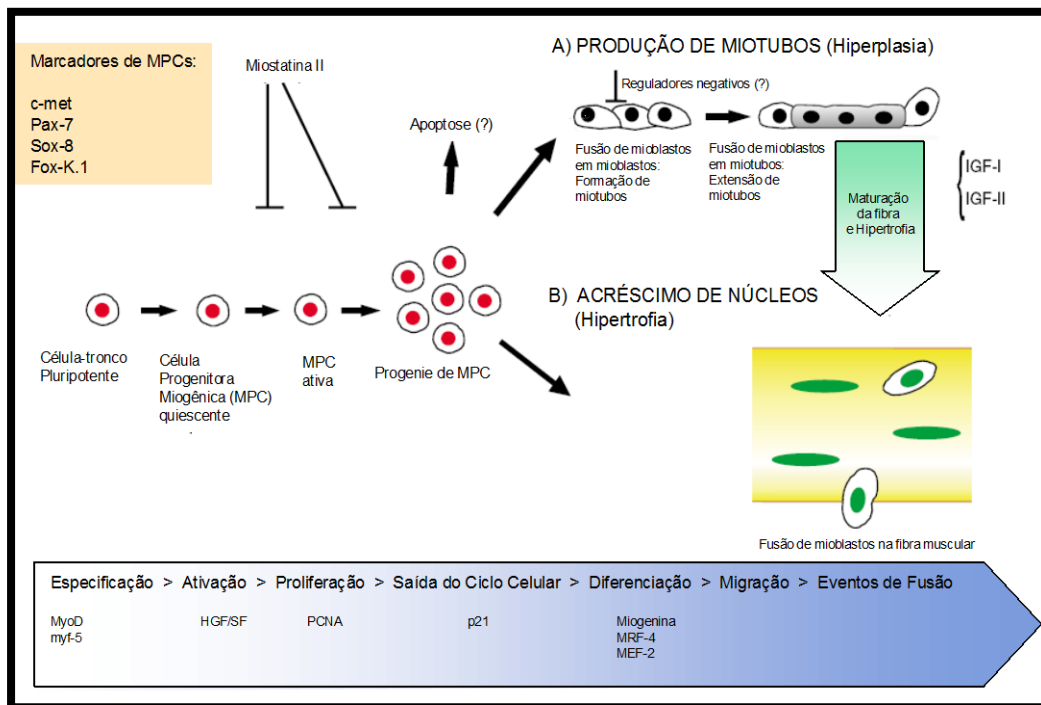


FIGURA 12 - Modelo descrevendo os principais eventos da miogênese no músculo esquelético de teleostes. Neste esquema, células pluripotentes tornam-se mioblastos, que estão comprometidos com um destino miogênico para formar a MPC, envolvendo a expressão de fatores reguladores miogênicos MyoD e myf-5. Após a ativação por HGF / SF as MPCs passam por divisões assimétricas gerando células comprometidas com a diferenciação terminal. Marcadores de MPCs incluem c-met, Pax-7, e os fatores de transcrição, sox-8 e Fox-K1. Segue-se uma fase de proliferação controlada pela expressão de PCNA e miosstatina- II e na saída do ciclo celular (regulado por p21), as MPCs iniciam a diferenciação envolvendo a expressão de miogenina, MRF-4 e MEF-2. Mioblastos podem fundir-se para formar miotubos em um evento de fusão mioblastos-mioblastos. Miotubos podem, ainda, receber mioblastos adicionais em um evento de fusão miotubo-mioblastos. FONTE: adaptado a partir de Johnston (2006).

Após a ativação pelo **HGF/SF** (Hepatocyte growth factor/Scatter factor), as MPCs passam por divisões assimétricas, formando novas MPCs e também células filhas comprometidas com a diferenciação terminal. Os marcadores de MPCs incluem **c-met** (o receptor de HGF/SF), a proteína *paired-box 7* (**Pax-7**) e os fatores de transcrição **sox-8** e **Fox-K1** (JOHNSTON, 2006).

A progênie de MPCs atravessa, então, uma fase de proliferação controlada por vias sinalizadoras positivas e negativas. Nesta fase, a proliferação celular é regulada positivamente pelo antígeno nuclear de proliferação celular (**PCNA**), que é um peptídeo associado à DNA polimerase δ (JOHNSTON, 2006). O PCNA é sintetizado no início das fases G1 e S do ciclo celular e sua expressão está relacionada com a síntese de DNA (BRAVO et al., 1987; BASERGA,

1991). A expressão do PCNA em associação ao MyoD em células miogênicas são marcadores de ativação destas células progenitoras miogênicas.

A **Miostatina II** é um importante regulador negativo do crescimento muscular e também pode regular negativamente a ativação das MPCs (JOHNSTON, 2006). A miostatina (GDF-8) é um membro da superfamília TGF- β (transforming growth factor – β), que é expresso predominantemente no músculo esquelético. Thomas e colaboradores (2000) demonstraram que a miostatina evita a progressão do ciclo de divisão celular nas células miogênicas, restringindo assim o crescimento muscular. O gene da miostatina é expresso em baixos níveis durante o desenvolvimento inicial e em altos níveis no peixe adulto (VIANELLO et al., 2003; JOHANSEN e OVERTURF, 2005), indicando um importante papel regulatório da miostatina durante a miogênese e o crescimento muscular, assim como ocorre em mamíferos (VIANELLO et al., 2003). A inibição da miostatina em transgênicos de zebrafish (*Danio rerio*) resultou em 20% de aumento no número de fibras musculares rápidas (XU et al., 2003).

Após sair do ciclo celular (regulado pelo **p21**), a progênie de MPCs inicia um programa de diferenciação envolvendo a expressão de MRFs e membros das famílias de genes **miogenina**, **MRF-4** e **MEF-2** (JOHNSTON, 2006) que atuam cooperando na indução e transcrição de genes músculo específicos (MARECO, 2012). Na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a expressão de MRF-4 e MEF-2 apresenta picos em peixes muito jovens, que estão iniciando a atividade natatória. Nesta fase se observa a ocorrência tanto de hiperplasia quanto de hipertrofia muscular (JOHANSEN e OVERTURF, 2005).

Em seguida, a progênie de MPCs pode migrar através do músculo e ter diversos destinos. Até cerca de 44% do comprimento final do peixe, os mioblastos da musculatura rápida podem se fundir para formar miotubos curtos em um evento denominado **fusão mioblasto-mioblasto** (JOHNSTON, 2006). Uma vez formados os miotubos, inicia-se um programa de miofibrilargênese e maturação de fibras musculares. A regulação do tamanho da fibra é controlada por vias de sinalização envolvendo o fator de crescimento semelhante à insulina I (**IGF-I**) e **IGF-II** (JOHNSTON, 2006). Em todos os estádios de crescimento da progênie de MPCs pode se fundir com as fibras musculares (**fusão mioblasto-fibra muscular**) em um processo de acréscimo de núcleos. À medida que o diâmetro e o comprimento da fibra muscular aumentam,

núcleos adicionais são requeridos para manter o domínio mionuclear (o volume de citoplasma controlado por cada núcleo) dentro de certos limites (JOHNSTON, 2006). Em mamíferos, o IGF-1 e as ações autócrinas de IGF-II têm maior atuação na regulação da massa muscular e no tamanho da fibra (BARTON-DAVIES et al., 1999). IGF-I ativa a via sinalizadora Akt-mTor, que tem um papel fundamental na regulação da síntese e degradação de proteínas dentro músculo (STITT et al., 2004; OHANNA et al., 2005). A transcrição autócrina de IGF-II exigida para a diferenciação da célula muscular esquelética é regulada pelo mTOR e pela disponibilidade de aminoácidos (ERBY et al., 2003). Assim, a linha central do mTOR-IGF fornece uma ligação molecular entre níveis nutritivos e síntese protéica que conduzem à hipertrofia da fibra muscular. O crescimento nos peixes também é controlado primariamente pela disponibilidade de hormônio do crescimento, o IGF-I e o IGF-II e seus respectivos receptores e proteínas ligantes de IGF (MORIYAMA et al., 2000; CASTILLO et al., 2002; CASTILLO et al., 2004; PETERSON et al., 2004). Em mamíferos, os níveis de mRNA de IGF-II diminuem durante o desenvolvimento pós-natal (DAUGHADAY e ROTWEIN, 1989). Por outro lado, o mRNA de IGF-II foi encontrado em níveis mais elevados do que mRNA de IGF-I em diversos tecidos de peixes adultos, incluindo o músculo e o fígado (GABILLARD et al., 2003; PETERSON et al., 2004).

O resultado do equilíbrio entre síntese e degradação protéica é a manutenção do fenótipo muscular durante o crescimento. Isto ocorre através da ação conjunta de fatores de regulação miogênica, fatores de crescimento e de hormônios (MARECO, 2012) que juntos desencadeiam uma cascata de eventos moleculares que poderão resultar em síntese ou degradação proteica (MATSAKAS e PATEL, 2009). Segundo relataram Patruno e seus colaboradores (2006), a participação desses fatores e seus mecanismos de ação são, de modo geral, bem conservados entre os vertebrados, embora possam ocorrer diferenças entre as espécies.

1.6 MATRIZ EXTRACELULAR

A **matriz extracelular** (MEC) é constituída principalmente por **colágenos**, **proteoglicanos** e **glicoproteínas** (GPs), formando um agregado molecular.

Este agregado possibilita a organização dos tecidos e a sobrevivência celular uma vez que é por meio destes que as células mantêm-se associadas (FRANCO et al., 2009). Destacam-se como propriedades da MEC: resistência mecânica (através do colágeno), elasticidade (através da elastina e proteoglicanos), resiliência do tecido, inter-relações entre a célula e a matriz, e coesividade (intermediada pelas glicoproteínas, como laminina, fibronectina, entactina e trombospondina) (HAY, 1984; 1991). Pode-se dizer que a matriz extracelular é uma fonte importante de sinais, que podem ser transduzidos para o núcleo, levando à expressão de genes específicos no desenvolvimento embrionário através de processos de indução. Dentre diversas interações, destacam-se: adesão entre células, adesão célula matriz e a comunicação de sinais para a diferenciação e divisão celulares (GILBERT, 2003).

Responsável pelas interações adesivas entre a célula e a matriz extracelular, existe uma classe de glicoproteínas chamada **fibronectina** (YAMADA, 1991). Além disso, a fibronectina também destaca-se nos processos de embriogênese, na qual sua expressão está relacionada com o estímulo da migração e diferenciação de diversos tipos celulares durante o desenvolvimento embrionário, além de atuar nos processos de reparo tecidual como moléculas de adesão para células e outras moléculas (YAMADA, 1991). Como exemplo, durante o desenvolvimento embrionário, células germinativas primordiais de vertebrados atravessam um ambiente rico em fibronectina durante os processos de migração (HEASMAN et al., 1981). Destaca-se ainda, a presença de fibronectina associada à lâmina basal durante a neurulação, atuando no processo de migração das células da crista neural (DUBAND e THIERY, 1982).

A conversão de somitômero para somito epitelial, em vertebrados, é observada quando as células mais anteriores do somitômero se tornam compactas. Duas proteínas da MEC e da superfície celular são sintetizadas durante a formação do somito: a fibronectina e N-caderina (LASH e YAMADA, 1986; HATTA et al., 1991). O mecanismo consiste na compactação dos somitômeros (células da placa segmentar) mais anteriores em somitos conforme esquema da Fig. 13 (PACKARD e MEIER, 1983).

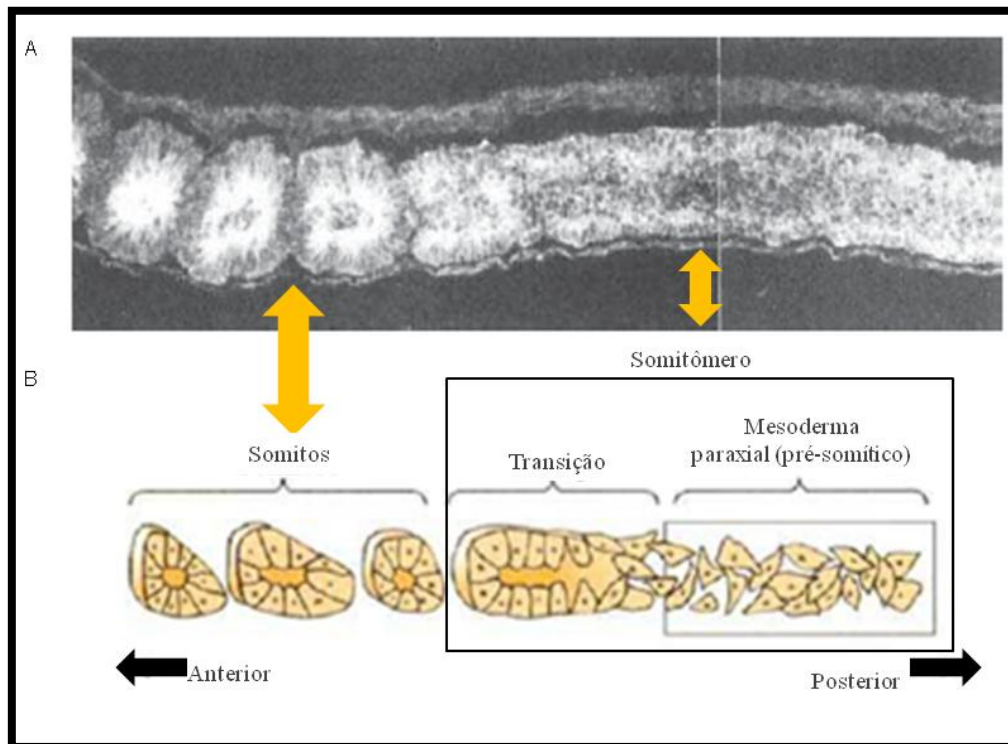


FIGURA 13 - Transição de um somitômero para um somito. Este fenômeno ocorre através da síntese de proteínas da MEC, fibronectina e N-caderina. (A) A expressão da N-caderina e fibronectina se correlacionam com a conversão de células mesenquimatosas soltas em um somito epitelial que, são controladas pela presença de Noch-1. (B) Esquema ilustrando a conversão de somitômero para somito (quando as células mais anteriores do somitômero se tornam compactas). FONTE: A de Hatta et al. (1991); cortesia de M. Takeichi; B Modificado segundo Conlon e colaboradores (1995) apud Gilbert (2003).

Os **glicosaminoglicanos** (GAGs) são moléculas que se apresentam ligadas à superfície celular, podendo ser encontradas abundantemente na matriz extracelular ou ancorados à membrana plasmática (TURNBULL et al., 2001). As funções biológicas estão relacionadas aos órgãos onde estes se encontram, no entanto, de forma geral, as suas propriedades estão relacionadas a processos de proliferação, adesão e migração celular (HANDEL et al., 2005). Os GAGs, ainda, podem interagir com diversas proteínas como as proteases e moléculas de sinalização extracelular, como as quimiocinas e **fatores de crescimento** (GILBERT, 2003; HANDEL et al., 2005). Durante o desenvolvimento muscular, células mediano-ventrais do somito (localizadas mais próximas ao tubo neural), tornam-se células mesenquimais novamente, e a porção do somito que dá origem a essas células é chamada de **esclerótomo** (é a primeira região a se diferenciar dos somitos) e essas células mesenquimatosas no final se tornam **condrócitos** vertebrais. A secreção de colágeno e GAGs (como o condroitin sulfato) resultam na construção do esqueleto axial (vértebras, costelas, cartilagem e ligamentos) (Fig. 14). Já as células da porção lateral do somito também se dispersam para formarem os

precursores dos músculos dos membros e da parede do corpo (GILBERT, 2003).

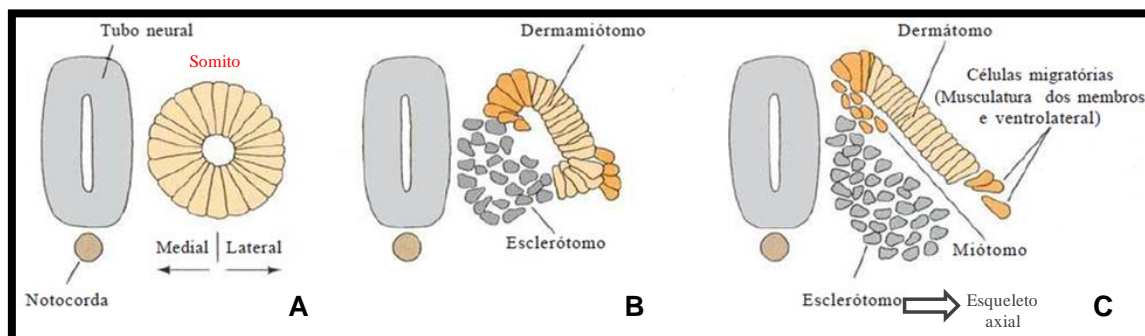


FIGURA 14 - Esquema da estrutura do somito de vertebrado em seção transversal. (A, B) as células mediano-ventrais do somito se tornam células mesenquimais novamente (**esclerótomo**) e começam a migrar afastando-se do dermatômo e miótomo para formarem o esqueleto axial (C) As migrações celulares que originarão a musculatura. FONTE: adaptado de Ordahl (1993) apud Gilbert (2003).

Os GAGs são constituídos de repetidas unidades dissacarídicas lineares (não ramificadas) complexas e heterogêneas (variam na composição e ligação) com carga negativa pela presença da sulfatação, formando polímeros e denominados desta maneira tanto em animais vertebrados e invertebrados (MEDEIROS et al., 2000; HANDEL et al.; 2005; RODRIGUES et al., 2009b). Estas unidades dissacarídicas são constituídas de um resíduo de açúcar não nitrogenado (ácido idurônico, ácido glucurônico ou galactose) e outro de hexosamina (glicosamina ou galactosamina) (ERNST et al., 1995) (Tabela 1). Destacam-se o **dermatan sulfato** (DS), **condroitim sulfato** (CS), **heparan sulfato** (HS), **queratan sulfato** (QS) e **ácido hialurônico** que, em geral, formam agregados poliméricos complexos denominados de proteoglicanos (NELSON e COX, 2005; WU et al., 2010 (Tabela 1; Fig. 15)). Medeiros e colaboradores sugeriram que essas moléculas são conservadas evolutivamente, uma vez que os GAGs são encontrados em todos os grupos do reino animal que apresentam organização tecidual.

Tabela 1- Principais glicosaminoglicanos e suas unidades dissacarídicas repetitivas.

| Glicosaminoglicano | Unidade dissacarídica |
|--------------------|---|
| Ácido hialurônico | Ácido glucurônico; N-acetilglucosamina |
| Condritin Sulfato | Ácido glucurônico, sulfato de N-acetilgalactosamina |
| Dermatan Sulfato | Ácido idurônico, sulfato de N-acetilgalactosamina |
| Heparan Sulfato | Ácido idurônico, sulfato de N-acetilglucosamina |
| Queratan Sulfato | Galactose, sulfato de N-acetilglucosamina |

FONTE: adaptado de Andrade (2007).

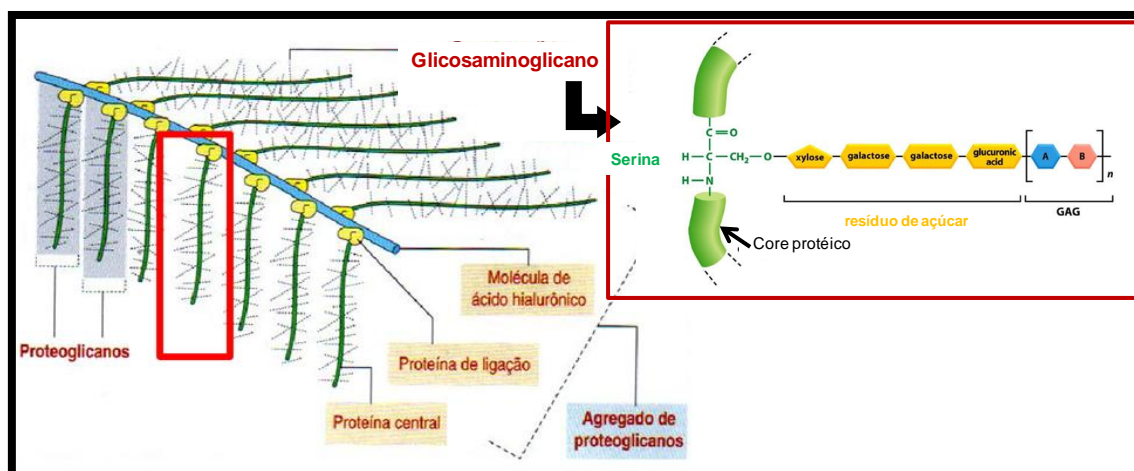


FIGURA15 - Esquema da estrutura de agregado de proteoglicanos. Os agregados de proteoglicanos são formados por: uma molécula axial de ácido hialurônico, proteínas centrais aderidas à molécula de ácido hialurônico por intermédio de uma proteína de ligação e de cadeias laterais de glicosaminoglicanos aderidos à proteína central. Várias cadeias de glicosaminoglicanos ligados à proteína central formam um proteoglicano. No detalhe a estrutura de um GAG: repetidas unidades dissacarídicas lineares constituídas de um resíduo de açúcar não nitrogenado (ácido idurônico, ácido glucurônico ou galactose) e outro de hexosamina (glicosamina ou galactosamina) ligadas à um core protéico através do aminoácido serina. FONTE: adaptado de Kierszenbaum (2008).

1.7 EFEITO DA TEMPERATURA NA MIOGÊNESE

O músculo estriado dos peixes apresenta grande plasticidade. As condições ambientais determinam a taxa de miogênese, a composição subcelular de organelas, o padrão de expressão gênica e o número e tamanho das fibras musculares (JOHNSTON, 2006; JOHNSTON et al., 2011). Durante os estádios embrionários e larvais, a plasticidade muscular em resposta às condições do ambiente, em geral, é irreversível devido à velocidade das alterações ontogenéticas (JOHNSTON, 2006) (Fig. 16).

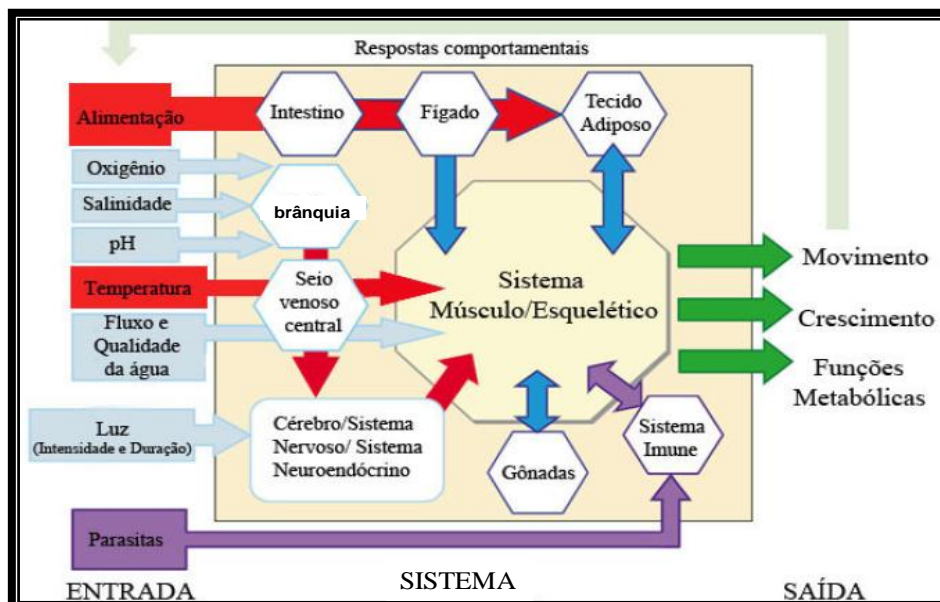


FIGURA 16 – Esquema demonstrando o efeito causado pelas modificações ambientais. Condições ambientais (oxigênio, salinidade, pH, temperatura, fluxo de água, iluminação) no sistema fisiológico podem afetar a histofisiologia e o fenótipo do músculo esquelético em peixes. FONTE: Adaptado de Johnston (2006).

Diversos estudos demonstraram que a temperatura de incubação dos embriões e larvas pode influenciar o desenvolvimento e o crescimento dos peixes. Variações da temperatura podem causar alterações fenotípicas, que refletem no número, tamanho e estado de diferenciação das fibras musculares, bem como nas propriedades contráteis e metabólicas do músculo esquelético dos peixes (STICKLAND et al., 1998; MOKSNESS et al., 1995; VIEIRA e JOHNSTON, 1992; JOHNSTON, 2001; VALENTE et al., 1999; RODRIGUES-GALDINO, 2009). Tais alterações podem levar a diferenças nas taxas de crescimento muscular, refletindo no tamanho das larvas e dos adultos. Como por exemplo, o salmão do atlântico (*Salmo salar* L.) que pode apresentar um aumento de 20% no número final de fibras musculares de acordo com a temperatura em que forem incubados (JOHNSTON et al., 2003). Ou o zebrafish (*Danio rerio*) incubado em diferentes temperaturas (22, 26 e 31°C), o qual apresentou maior comprimento final e maior número de fibras em embriões cultivados à 26° C quando comparados aqueles incubados às temperaturas experimentais extremas (31°C) (JOHNSTON et al., 2009). Peixes incubados em temperatura acima daquelas mais frequentes no ambiente apresentaram um número menor de fibras musculares de maior diâmetro e um maior número daquelas de pequeno diâmetro (STICKLAND et al., 1998; VIEIRA e JOHNSTON, 1992). Isto caracteriza, como dito anteriormente, hiperplasia, ou seja, recrutamento de mioblastos para a formação de novas fibras. Por outro

lado, peixes de várias espécies incubados em baixas temperaturas apresentam um maior número total de fibras musculares, bem como de vértebras (STICKLAND et al., 1998; NATHANAILIDES et al., 1996).

A temperatura é um fator crítico no desenvolvimento dos peixes. Geralmente temperaturas mais baixas retardam os padrões de desenvolvimento nos peixes e temperaturas mais altas os aceleram (SAKA et al., 2004). Contudo, El-Sayed (2006) afirma que, em geral, a taxa de desenvolvimento e crescimento dos peixes aumenta na medida em que a temperatura da água aumenta. Essa característica ocorre até que se atinja a temperatura próxima à temperatura ótima para o cultivo da espécie. Na produção de peixes em larga escala, a economia geralmente exige que os espécimes cultivados atinjam o tamanho ideal no menor tempo possível. Sendo assim, são frequentemente utilizadas temperaturas elevadas para que o desenvolvimento inicial dos peixes seja acelerado (PETERSON et al., 2004). Entretanto, tanto Klimmogianni e colaboradores (2004), quanto Saka e colaboradores (2004) consideram a possibilidade da incubação em temperaturas mais altas provocar um maior número de malformações tanto no sistema cardíaco quanto nas regiões cefálica e caudal. Além disso, altas temperaturas durante o desenvolvimento podem causar efeitos em longo prazo na celularidade (densidade de células) muscular (FINN, 2007).

Foi verificado que a incubação em diferentes temperaturas desvincula o crescimento e a diferenciação de várias características críticas à natação, incluindo o desenvolvimento de nadadeiras e a aquisição dos padrões adultos de inervação e composição de proteínas miofibrilares (actina e miosina) (JOHNSTON et al., 1997). Em *Clupea harengus* a síntese de miofibrilas ocorre em estádios mais avançados do desenvolvimento em embriões incubados em temperaturas mais baixas. Por exemplo, no estágio de 50 somitos, as miofibrilas são encontradas nas células dos 31 primeiros somitos a 12°C, mas somente nos 20 primeiros somitos a 5°C (JOHNSTON et al., 1997). Tais efeitos da temperatura no desenvolvimento podem influenciar a sobrevivência das larvas.

1.8 O JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

Os Siluriformes, representados pelos bagres, vêm apresentando destaque na piscicultura nacional. Dentre estes, o jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy e Gaimard, 1824) é uma espécie de água doce nativa das Américas Central e Sul (SILFVERGRIP, 1996), adaptada a diferentes ambientes e que vem apresentando bons resultados em viveiros de piscicultura, principalmente no Sul do Brasil. É uma espécie sedentária com preferência por ambientes lânticos, sendo considerada onívora e generalista em relação aos hábitos alimentares (Fig. 17) (BALDISSEROTTO e RADÜNZ NETO, 2004).



FIGURA 17 - Exemplar adulto de *Rhamdia quelen*.

FONTE: <http://www.santaregina.com.br/index.php?acao=17ecodigo=48> (2013).

O jundiá apresenta excelente aceitação pelo mercado consumidor, tanto para pesca esportiva quanto para consumo direto (CARNEIRO et al., 2003; BALDISSEROTTO e RADÜNZ NETO, 2004). É um peixe de rápido crescimento, com fácil adaptação à criação intensiva, rústico, facilmente induzido à reprodução, com altas taxas de fecundação, apresentando carne saborosa com baixo teor de gordura e poucos ossos intramusculares (LUCHINI e AVENDAÑO, 1985). Por estas razões, a espécie tem atraído a atenção de produtores e pesquisadores devido a várias características favoráveis à sua criação e comercialização (GOMES et al., 2000).

São euritérmicos, sendo que as larvas toleram temperaturas entre 15 e 34°C (CHIPPARI-GOMES et al., 1999), sobrevivendo durante invernos frios e crescendo rapidamente no verão (BARCELLOS et al., 2002). Vale ressaltar que

a temperatura média da água no sul do Brasil, onde existe a cultura extensiva deste bagre, varia entre 15 e 30°C (CHIPPARI-GOMES et al., 1999).

De acordo com Gomes e colaboradores (2000), os estudos a respeito dos parâmetros físico-químicos da água e o crescimento em cativeiro são essenciais para melhorar o uso desta espécie na cultura de peixes. Além de serem euritérmicos, toleram uma faixa de pH ambiental relativamente ampla (6,0 a 9,0) nos períodos embrionário e larval (FERREIRA et al., 2000). No entanto, os alevinos sobrevivem em uma faixa estreita de sais dissolvidos na água, sendo classificados como estenoalinos (MARCHIORO e BALDISSEROTTO, 1999).

A criação do jundiá vem crescendo de forma constante e acelerada nos últimos anos, demandando esforços dos grupos de pesquisa envolvidos em trabalhos científicos voltados ao conhecimento desta espécie e suas particularidades quando mantida em cativeiro. A variabilidade de ambientes de distribuição do jundiá sugere que seus embriões e larvas possam ser incubados com relativo sucesso em ampla faixa de temperaturas. Faz-se necessário, entretanto, estudos mais específicos, possibilitando o desenvolvimento de estratégias que possam reduzir as perdas na larvicultura e criando, desta forma, novas perspectivas para o cultivo intensivo desta espécie.

2JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Biologia Adaptativa - UFPR) vem estudando o desenvolvimento e crescimento do jundiá em colaboração com o Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUC-PR. Os principais objetivos do grupo são gerar conhecimentos que possam ser aplicados à piscicultura, melhorando a produtividade da espécie. Paralelamente, são levantadas questões relacionadas aos mecanismos morfofisiológicos, celulares e moleculares que ocorrem durante o desenvolvimento desses organismos, cujos resultados podem contribuir para o entendimento da biologia do desenvolvimento dos vertebrados.

Inicialmente, o grupo descreveu detalhadamente todos os estádios do desenvolvimento embrionário e larval do jundiá, destacando os principais eventos da organogênese da espécie (MAIOLINO, 2012; ARAÚJO, 2011; RODRIGUES-GALDINO et al., 2010; RODRIGUES-GALDINO, 2009; FORGATI, 2008; MAIOLINO et al., 2008a; 2008b; RODRIGUES-GALDINO, 2006). Resultados prévios do grupo indicaram que a temperatura não interfere em determinados processos, como a ocorrência dos movimentos morfogênicos durante a gastrulação (RODRIGUES-GALDINO et al., 2007b). Todavia, temperaturas mais altas aceleram o desenvolvimento embrionário do jundiá. Peixes incubados a 21°C eclodiram 43 horas após a fertilização (hpf), enquanto que aqueles incubados a 30°C eclodiram 19 hpf (FORGATI et al., 2007a; 2007b; RODRIGUES-GALDINO et al., 2010).

Durante meu trabalho de mestrado (RODRIGUES-GALDINO, 2009), foram verificadas variações na taxa de sobrevivência, ocorrência de malformações e no tamanho das larvas incubadas nas diversas temperaturas (18, 21, 24, 27 e 30°C). Estes resultados sugerem diferenças no crescimento muscular devido à temperatura. Foi determinada, ainda, a composição centesimal dos organismos, permitindo inferências sobre potenciais diferenças nas propriedades nutricionais e organolépticas da carne do peixe adulto devido à temperatura de incubação nos períodos iniciais do desenvolvimento.

Estes trabalhos prévios levantaram questões a respeito do efeito da temperatura de incubação nos mecanismos envolvidos na formação e no crescimento do músculo esquelético. Os resultados obtidos pelo estudo

morfoanatômico, sugerem que as complexas vias de sinalização relacionadas à diferenciação celular das fibras musculares, bem como o padrão de distribuição dessas células, podem ser alterados pela temperatura. Isto indica, por exemplo, que dependendo das condições ambientais, o crescimento muscular pode alternar entre hipertrofia e hiperplasia, resultando em diferenças de celularidade, que refletirão na quantidade e qualidade da carne resultante.

O presente estudo visa verificar os efeitos de duas diferentes temperaturas na formação e no crescimento muscular desta espécie de interesse comercial. O estudo levanta as seguintes questões: (i) A estrutura e ultraestrutura muscular podem ser alteradas pela temperatura? (ii) Que etapas da miogênese são alteradas pela temperatura? (iii) Quais reguladores miogênicos estão envolvidos na variação de celularidade (número e diâmetro de fibras musculares) imposta pela variação térmica ambiental?

As temperaturas experimentais (21 e 27°C) foram escolhidas com base em estudo prévio (dissertação de mestrado). Naquele estudo, as duas temperaturas extremas provocaram baixa taxa de sobrevivência e altos índices de malformações, indicando que são inadequadas para a incubação da espécie. Os organismos incubados em 24 e 27°C apresentaram resultados semelhantes, ao contrário daqueles incubados a 21°C, que embora tenham apresentado alta taxa de sobrevivência como nas outras temperaturas, desenvolveram-se de forma muito lenta, mas atingiram maiores tamanhos.

O desenvolvimento de estratégias que reduzam as perdas na larvicultura pode criar novas perspectivas para o cultivo intensivo de peixes. Os resultados deste estudo trarão subsídios para melhorar os resultados na larvicultura e, conseqüentemente na produção do jundiá, além de contribuir para enriquecer o conhecimento sobre a biologia do desenvolvimento de vertebrados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos da temperatura no padrão de marcação de reguladores miogênicos, bem como na diferenciação e no crescimento muscular do jundiá (*Rhamdia quelen*) durante o desenvolvimento inicial.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Determinar o padrão de marcação e a distribuição espacial dos reguladores miogênicos MyoD e miogenina no jundiá (*Rhamdia quelen*) desde o período inicial de segmentação até 7 dias após a eclosão de organismos incubados a 21 e 27°C.
- 3.2.2 Verificar a estrutura e ultraestrutura, o estado de diferenciação e o padrão de expressão da miosina das células miogênicas e fibras musculares no jundiá (*Rhamdia quelen*) desde o período inicial de segmentação até 7 dias após a eclosão de organismos incubados a 21 e 27°C.
- 3.2.3 Observar se a ocorrência de crescimento muscular por hipertrofia e por hiperplasia apresenta relação com a temperatura de incubação (21 e 27°C) no jundiá (*Rhamdia quelen*) até 7 dias após a eclosão.
- 3.2.4 Analisar o crescimento muscular e sua relação com os eventos de morfogênese, diferenciação e divisão celular que ocorrem na matriz celular ao redor destas células através da composição de proteoglicanos e/ou glicosaminoglicanos no jundiá (*Rhamdia quelen*) desde o período inicial de segmentação até 7 dias após a eclosão de organismos incubados a 21 e 27°C.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESOVA E FERTILIZAÇÃO

Os ovos de *Rhamdia quelen* (jundiá) foram obtidos no Laboratório de Pesquisas em Piscicultura da PUCPR (São José dos Pinhais – PR) por desova induzida (hipofização) de um pool de exemplares machos e fêmeas sexualmente maduros e fertilização *in vitro* (Fig. 18), de acordo com procedimentos de rotina daquele laboratório. Em seguida, os ovos fertilizados foram cuidadosamente transportados em galões plásticos (5L) contendo água de poço artesiano em aproximadamente 30 min à temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Foram então incubados no Laboratório de Biologia Adaptativa do Departamento de Biologia Celular da UFPR (Curitiba-PR), conforme descrito abaixo.

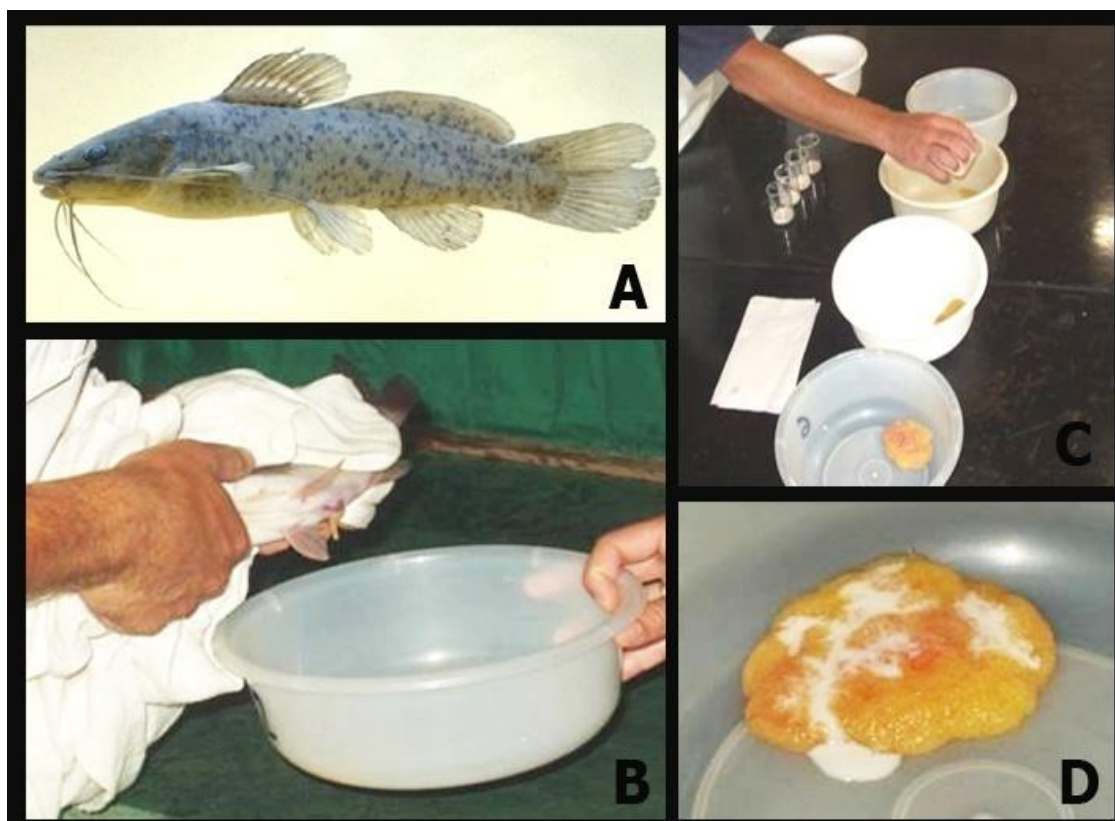


FIGURA 18 - Procedimento de extrusão e fertilização *in vitro* em *Rhamdia quelen*. O jundiá durante o período reprodutivo da espécie (primavera/verão) – A) Exemplar adulto (com aproximadamente 12 meses de idade). Fonte: USGS (2006). B) Extrusão dos ovócitos. C) Mistura dos gametas masculinos aos femininos. D) Ovócitos e esperma antes da hidratação. FONTE: Rodrigues-Galdino (2009).

4.2 BIOENSAIOS E AMOSTRAGEM

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (certificado nº 316, Processo 23075.019887/2008-05; Anexo I).

Duas horas após fertilização (hpf), cerca de 4500 embriões¹ no estágio de blástula E8/E9 (estadiamento de acordo com RODRIGUES-GALDINO et al., 2010, Anexo III) foram transferidos para aquários, com água filtrada, em sistema estático e temperatura controlada (21°C e 27°C). O número de ovos por litro foi mantido constante (800 ovos/L). Os embriões e larvas iniciais foram incubados até 48 hpf em caixas plásticas com capacidade para 6L (contendo 5L de água) (Fig. 19A, B e C). Após este período de incubação, as larvas foram transferidas para os aquários de vidro cobertos com papel contact preto² (Fig. 19D) e mantidas sob as mesmas condições experimentais.

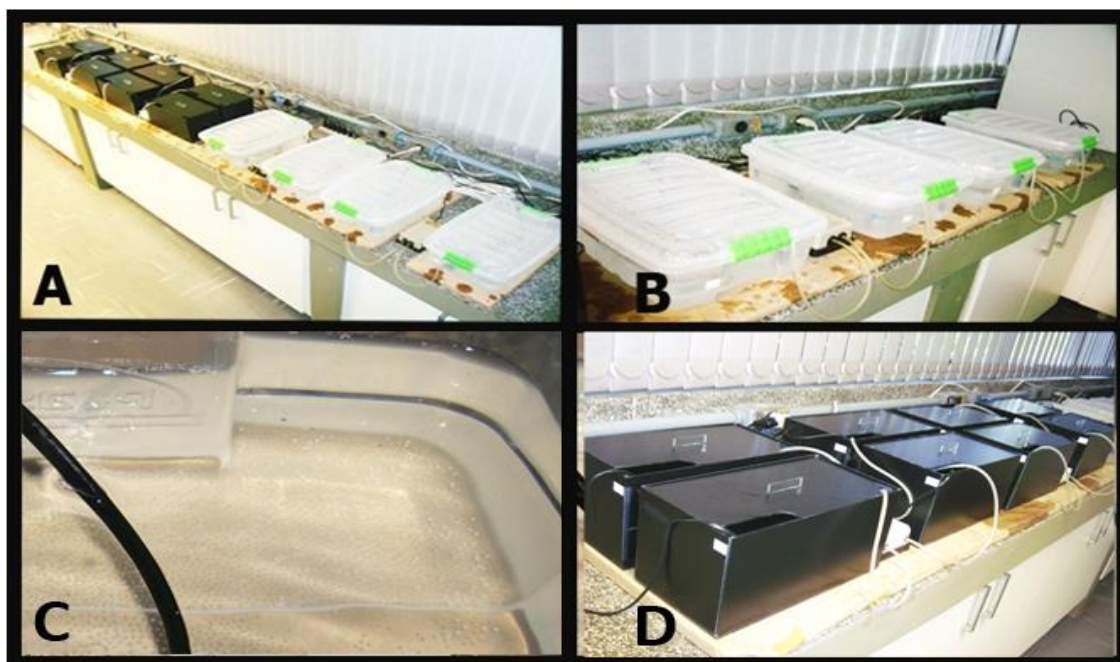


FIGURA 19 – Bioensaios com diferentes temperaturas de incubação de embriões de *Rhamdia quelen*. A) Aquários e caixas plásticas utilizados na incubação de embriões de *Rhamdia quelen* nas diferentes temperaturas. B) Caixas plásticas usadas na incubação dos embriões e larvas até 48 hpf. C) Caixa plástica, com ovos em incubação, logo após a fertilização. D) Aquários escuros. FONTE: Souza (2012).

¹ A quantificação dos embriões foi estimada pelo volume, sabendo-se que cada mililitro contém aproximadamente 150 embriões.

² Estas condições de transferência foram estabelecidas através de testes realizados previamente, objetivando melhores condições de adaptabilidade de incubação de embriões e larvas às circunstâncias laboratoriais e também à logística laboratorial.

Após 72 hpf (E27+), as larvas passaram a ser alimentadas diariamente com embriões de artêmias (*Artemia* sp.) sem córion e ração comercial para alevinos. Foram realizadas trocas parciais da água diariamente (20% do volume total).

A amostragem foi realizada nos seguintes estádios do desenvolvimento: 10 somitos (estádio 18), 18 somitos (estádio 20), 25 somitos (estádio 21), eclosão (estádio 25), larva de 24h (estádio 26), larva de 48h (estádio 27), pós-larva de 7 dias (estádio 29) em cada tempo para as duas temperaturas. Imagens dos embriões *in vivo* foram capturadas no momento da amostragem, sob um fotomicroscópio Quimis acoplado a uma câmera digital (Sony Cyber Shot). A Tabela 2 indica quais análises foram feitas e quantos indivíduos foram amostrados em cada réplica de cada tratamento. Os embriões foram retirados dos aquários com uma pipeta e então congelados ou colocados em frascos contendo fixador, conforme descrito abaixo.

Tabela 2- Estádios em que os embriões, larvas e pós-larvas de *Rhamdia quelen* foram amostrados. Amostragem após incubação em diferentes temperaturas indicando os objetivos de cada análise e tamanho amostral em cada réplica de cada situação experimental.

| ANÁLISES | OBJETIVOS | ESTÁDIOS |
|---|--|---|
| MORFOMETRIA | • ocorrência de crescimento muscular por hipertrofia e por hiperplasia | L 24 (estádio 26) (n=6), L 48 (estádio 27) (n=6), PL 7 (estádio 29) (n=6) |
| MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO | • ultraestrutura e o estado de diferenciação celular das células miogênicas e fibras musculares | E (estádio 25) (n=4)*, L 24 (estádio 26) (n=4)*, L 48 (estádio 27) (n=4)*, PL 7 (estádio 29) (n=4)* |
| IMUNOHISTOQUÍMICA | • padrão de expressão e distribuição espacial dos reguladores miogênicos | E (estádio 25) (n=8)**, L 24 (estádio 26) (n=8)**, L 48 (estádio 27) (n=8)**, PL 7 (estádio 29) (n=8)** |
| GLICOSAMINOGLICANOS | • avaliar o papel destes glicoconjugados no tecido muscular e sua relação com os eventos de morfogênese, diferenciação, divisão celular e crescimento muscular | 10 S (estádio 18) (n=40), 18 S (estádio 20), (n=40) 25 S (estádio 21) (n=40), E (estádio 25) (n=40), L 24 (estádio 26) (n=40), L 48 (estádio 27) (n=40), PL 7 (estádio 29) (n=40) |

n indica o número de indivíduos utilizados nas análises a 21 e 27°C, sendo que foi utilizado metade de cada amostra para cada temperatura. *Foi utilizado um embrião ou larva para o corte transversal e um para o longitudinal. **Foi utilizado um embrião ou larva de cada temperatura para cada grupo de anticorpos (MyoD + Ácido Hialurônico; Miosina + Ácido Hialurônico; Miogenina). FONTE: o autor.

Durante o ano de 2010 foram realizados dois bioensaios, sendo o primeiro em fevereiro e o segundo em março. Cada bioensaio foi realizado em triplicata (R1, R2 e R3) e nas duas temperaturas propostas (21 e 27°C). Durante o ano de 2011 foram realizados três bioensaios, sendo o primeiro em janeiro, o segundo em fevereiro e o último em março, conforme a Tabela 3. Nestes bioensaios foram coletadas amostras para todas as análises de: Microscopia de Luz e Eletrônica de Transmissão, Imunohistoquímica e Glicosaminoglicanos Sulfatados.

Tabela 3 - Número de Bioensaios realizados para este estudo.

| Ano | Meses | | |
|------|---------|-----------|-------|
| | Janeiro | Fevereiro | Março |
| 2010 | - | 1 | 1 |
| 2011 | 1 | 1 | 1 |

FONTE: o autor.

4.3 ESTRUTURA DO TECIDO MUSCULAR E MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES

As amostras foram fixadas em PFA 4% (paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4) por 3h em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas e mantidas em tampão PBS 0,1M sob refrigeração (4°C) até processamento.

Após a lavagem com tampão fosfato de sódio 0,1M para retirada do excesso do fixador e desidratação em série alcoólica crescente, as amostras foram infiltradas por uma semana e emblocadas em Historesina Leica® segundo procedimento padrão (desidratação, infiltração, emblocagem, corte, coloração, fotodocumentação) descrito no ANEXO II.

Os cortes foram obtidos com navalhas de tungstênio em micrótomo convencional Leica® e corados com Hematoxilina-Eosina e/ou Azul de Toluidina. As lâminas foram analisadas e documentadas sob microscópio de luz (Zeiss® - Imager. Z2) com o auxílio de scanner de lâminas (MetaSystems) acoplado a ele.

A morfologia do tecido muscular das larvas e pós-larvas foi analisada através de scanner de lâminas (Zeiss® - Imager. Z2). Com isso, lâminas com cortes correspondentes à mesma região corpórea (determinados com base na morfologia dos órgãos presentes na altura do tronco, como mostra a Fig. 20) foram selecionadas para se determinar a densidade das fibras em relação aos diferentes tratamentos, o que totalizou em média 30 cortes de cada estágio e em cada situação experimental.

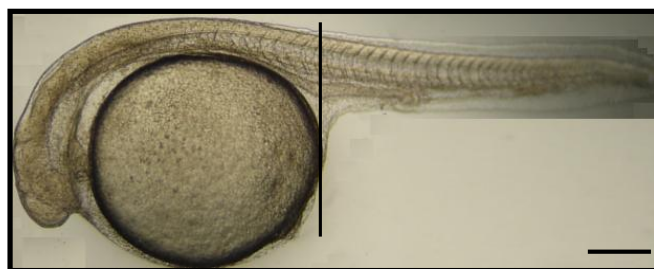


FIGURA 20 – Representação em microscopia de luz de larva em eclosão de jundiá. Indica-se a altura aproximada em que foram realizados os cortes nas larvas de *R. quelen* a fim de estimar a densidade e área das fibras musculares esqueléticas em relação as diferentes temperaturas. Escala: 500µm. FONTE: o autor.

Pela técnica do duplo cego, as imagens foram devidamente enumeradas para posterior identificação dos tratamentos correspondentes. Utilizando o programa MetaSystems/VSViewer, foi medida a área total da região contendo tecido muscular estriado esquelético de cada corte, bem como a área superficial e o perímetro de 10 fibras musculares individuais, escolhidas aleatoriamente. Foi realizado também a quantificação do número total das fibras musculares na região onde foi medida a área em todas as imagens obtidas. A densidade de fibras musculares (fibras por mm^2) foi calculada com base no número de fibras presentes por área total de músculo, conforme o esquema representativo da Fig. 21.

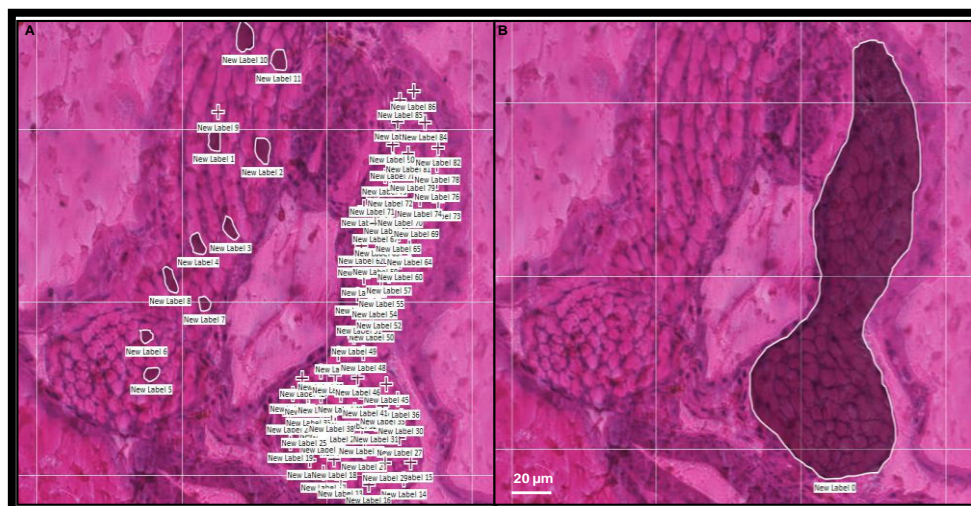


FIGURA 21 - Esquema ilustrativo da morfometria das fibras musculares. (A) Ao lado esquerdo a área de 10 fibras musculares aleatórias e a direita a contagem do número total de fibras na região muscular da larva, e (B) delimitação da área total de músculo. Escala: 20µm. FONTE: o autor.

4.4 ULTRAESTRUTURA DAS FIBRAS MUSCULARES

Após coletadas, as amostras foram fixadas em Karnovsky (Paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 a 4°C) por 3h em temperatura ambiente e posteriormente lavadas em tampão cacodilato 0,1M sob refrigeração (4°C) até processamento. Foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% (tampão cacodilato 0,1M pH 7.2) e contrastadas com acetato de uranila 2%. Após emblocagem em Epon-812 os cortes ultrafinos obtidos em ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT-2 foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% e citrato de chumbo conforme procedimento padrão. A observação do material foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

4.5 IMUNOMARCAÇÃO DAS FIBRAS MUSCULARES

As amostras foram fixadas em PFA 2% (Paraformaldeído 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4) por 2h em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em PBS 0,1M e mantidas sob refrigeração (4°C).

Após a fixação, o material foi lavado em PBS 0,1 M, permeabilizou-se com PBS em Triton X-100 0,5% overnight, lavou-se e foi realizado o bloqueio da

fluorescência do PFA incubando as amostras em glicina 1% e lavou-se em PBS 0,1M. Seguiu-se a incubação em PBS 0,1M em Triton X-100 0,5% e BSA 1% por 1h para o bloqueio dos sítios inespecíficos nas larvas e pós-larvas inteiras. Seguiu-se o procedimento de imunohistoquímica de fluorescência, no qual o anticorpo primário liga-se especificamente ao substrato (BSA 1% em PBS 0,1M, Triton X-100 e anticorpo primário por 4h), seguido pelas lavagens em PBS 0,1M em Triton X-100 0,5% uma vez e apenas em PBS 0,1M por quatro vezes (bloqueio para o anticorpo secundário), seguindo a ligação do anticorpo secundário conjugado com fluoróforo ao primário (BSA 1% em PBS 0,1M, Triton X-100 0,5% por 1h) e excitação pelo laser para detecção do sinal (Fig. 22).

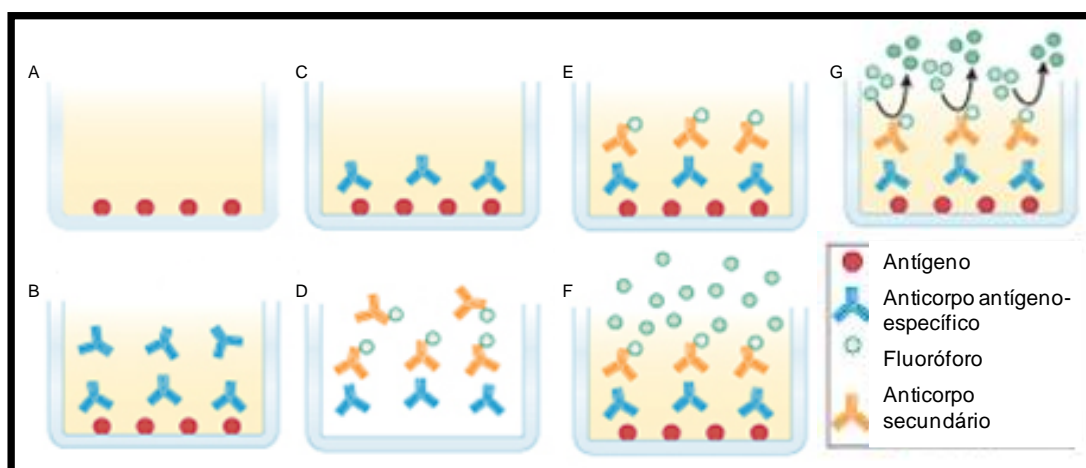


FIGURA 22 - Esquema ilustrativo da reação imunohistoquímica. (A) antígeno ou substrato no poço (amostra), (B) Adição de tampão contendo o anticorpo (primário) antígeno específico, incubação e lavagem, (C) a ligação ocorre apenas entre anticorpo e antígeno específico, (D) adição de anticorpos secundários marcados, incubação e lavagem, (E) Ligação do anticorpo secundário ao primário, (F) Adição de fluoróforo e (G) cor gerada à partir do grau de especificidade da ligação entre antígeno-anticorpo. FONTE: adaptado de Actor (2007).

A incubação com o anticorpo primário:

- anti-MF20 monoclonal anti-mouse (reage com a cabeça pesada da **miosina** sarcomérica, dita meromiosina – Fig. 23),
- anti-F5D monoclonal anti-mouse que reage com **miogenina**, provavelmente controlando a transição mioblasto-miotubo (o epítipo localiza-se na extremidade carboxiterminal do domínio HLH da proteína miogenina),
- anti-D7F2 monoclonal anti-mouse que reconhece **MyoDa** e **MyoDb** (reconhece um epítipo próximo a região N-terminal de MyoD).

Todos eles da Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), University of Iowa, USA), e:

- sonda para **ácido hialurônico** biotinilada (reconhecem as duas proteína da matriz extracelular) (adquiridos da Prof. Dra. Helena B. Nader – UNIFESP).

Todos adequadamente diluídos em tampão BSA 1% em PBS 0,1M, Triton X-100 0,5%, conforme o protocolo descrito no ANEXO II.

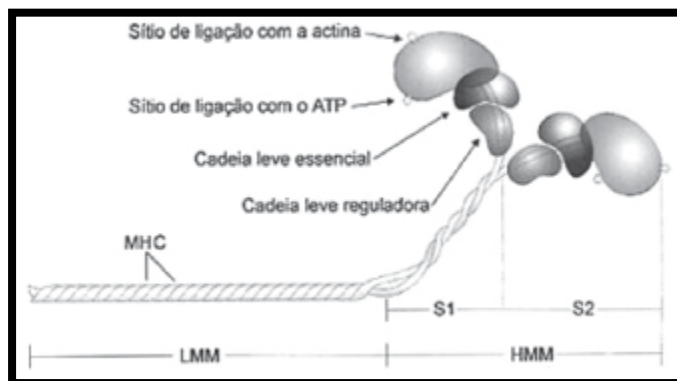


FIGURA 23 - Esquema da molécula de miosina. Cada molécula de miosina é composta por duas cadeias pesadas de miosina (MHC) e quatro cadeias leves de miosina (MLC). As MHC podem ser clivadas e gerar as meromiosinas leves (LMM) e pesadas (HMM). O anticorpo reconhece as meromiosinas na cabeça da molécula. FONTE: Dal Pai-Silva e colaboradores (2005).

Após lavagem seguiu-se a incubação com os respectivos anticorpos secundários fluorescentes anti-mouse conjugado com Alexa Fluóor 488 para os anticorpos que marcam tecido muscular estriado esquelético, e Streptavidina para Ácido Hialurônico (conjugado com fluoróforo 594- vermelho). Todos os anticorpos secundários foram diluídos em PBS 0,1M em Triton X-100 e BSA 1%. As células foram incubadas com DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindole,dihidrocloride) intercalante de DNA (Molecular Probe, Eugene, OR, USA) por 15 minutos em uma diluição de 1:1000 em PBS 0,1M. O material foi lavado cinco vezes em PBS 0,1M e concluiu-se com a montagem em lâmina escavada em Fluoromunt-G com DAPI, segundo procedimento padrão. A observação dos resultados e obtenção das imagens foi realizada em microscópio fluorescente Confocal Leica CTR6500/TCS SP5 no Instituto Carlos Chagas, Curitiba-PR.

4.6 GLICOSAMINOGLICANOS

Para identificação e quantificação de glicosaminoglicanos foi utilizado o método desenvolvido por Jaques e colaboradores (1968) e modificado por Dietrich e Dietrich (1976).

Para esta análise, um pool de 40 embriões e larvas de cada estágio e cada temperatura experimental foi lavado e mantido em acetona por quatro dias à 4°C. O material foi devidamente macerado para que a acetona entrasse em contato com a amostra por completo, pois ela é a responsável por clivar a ligação do GAG com o core protéico. Os detalhes do protocolo estão descritos no ANEXO II.

Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10min, o sobrenadante foi eliminado e o pellet foi desidratado à temperatura ambiente para obtenção do pó cetônico. Para degradação das proteínas, as amostras foram incubadas com Maxatase 3mg/mL em TRis/HCl 0,05 M pH 8.0 e NaCl 0,15M overnight a 56°C. Foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) lentamente e centrifugado por 15min a 4°C. O sobrenadante (que contém os carboidratos-GAGs) foi coletado em um novo tubo e adicionado três vezes o volume de Etanol 100% e deixado overnight a 20°C. O etanol desidrata o carboidrato e o mesmo por consequência desce no tubo. Após uma nova centrifugação de 15min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados à temperatura ambiente para secar. Após desidratação, foi adicionado 25 µL de água Milli-Q para resuspende o conteúdo de GAGs.

A agarose (0,55%) (Standard Low-MR da Bio-Rad Laboratories, Inc-Hercules, CA, USA) foi dissolvida no tampão PDA e depositada sobre lâminas de vidro de 7,5 x 7,5cm e com uma espessura de 0,2 cm de gel. Os proteoglicanos e/ou glicosaminoglicanos foram submetidos à eletroforese em caixa refrigerada, utilizando o mesmo tampão do gel. A corrida eletroforética dos compostos foi realizada com uma diferença de potencial de 100V e 300mA por 2h30min ou até que o vermelho de cresol usado como indicador da corrida, migrasse a distância desejada. Os glicosaminoglicanos: condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) ou heparam sulfato (HS) foram empregados como padrão. A origem da corrida eletroforética é o pólo negativo, visto que estes compostos são altamente aniônicos, desta forma migram para o pólo positivo. Após a eletroforese os compostos foram precipitados com CETAVLON

(brometo de cetiltrimetilamônia da Merck, Darmstadt, Alemanha) 0,1%, por um período de no mínimo 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram secas, sob ação de calor e ventilação. A seguir, o gel foi corado com azul de toluidina (Fisher Scientific Co. Fair Lawn, NY, USA) 0,1% em ácido acético 1% e etanol 50%. O excesso de corante foi removido com solução descorante (ácido acético 1% em etanol 50%). As lâminas foram secas a temperatura ambiente. Por último, o gel foi fotografado utilizando câmera digital Sony Cyber Shot.

Os padrões de glicosaminoglicanos utilizados foram condroitim-4-sulfato (extraído de cartilagem de baleia) e condroitim-6-sulfato (extraído de cartilagem de tubarão) (Seikagaku, Kogyo, Tóquio, Japan), dermatam sulfato e heparam sulfato (extraídos respectivamente de pele de porco e pâncreas bovino) Foi utilizado o tampão 1,3 diaminopropano acetato (PDA) 0,05M, pH 9,0. (Aldrich Chem. Co.). Este tampão discrimina o perfil migratório dos compostos de acordo com a interação com a diamina presente no tampão. Pela ordem decrescente de mobilidade eletroforética temos: condroitim 4 e 6 sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS). Assim o condroitim sulfato 4 e 6 que apresentam menor interação com a diamina.

4.7 ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste *t* para avaliar se havia diferença significativa no crescimento da área muscular, no aumento do número e área das fibras musculares, e a densidade entre as temperaturas, em cada um dos estádios de desenvolvimento. Antes de realizar o teste *t* para comparar as diferenças no crescimento nas duas temperaturas foi verificada a normalidade das amostras. Se a interação for significativa, a temperatura afeta o crescimento. As análises estatísticas foram feitas pelo software STATISTICA® e os gráficos gerados no software GraphPad Prism 5®. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 ESTRUTURA DO TECIDO MUSCULAR E MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES

A análise da morfometria das fibras musculares das larvas e pós-larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em secção transversal sob microscopia de luz (Fig. 24, 25 e 26) possibilitou observar que houve diferença no padrão de desenvolvimento do músculo esquelético entre as temperaturas 21 e 27°C quando analisados os estádios de larva 24, 48 hpe e pós-larva 7 dpe, sob estas condições experimentais.

A área total coberta por musculatura esquelética e o número de fibras musculares presentes nesta área não variou nas larvas (24 e 48 hpe) entre 21 e 27°C. No entanto, as pós-larvas (7 dpe) incubadas a 27°C apresentaram maior área total em secção transversal ocupada pela musculatura ($0,054 \pm 0,005 \text{ mm}^2$) quando comparados àqueles incubados a 21°C ($0,046 \pm 0,005 \text{ mm}^2$) (Fig. 24 A, Tab.4). Por outro lado, o número total de células musculares das pós-larvas foi menor a 27°C ($300,85 \pm 38,69$) quando comparadas às pós-larvas incubadas a 21°C ($343,65 \pm 73,29$) (Fig. 24 B, Tab.4).

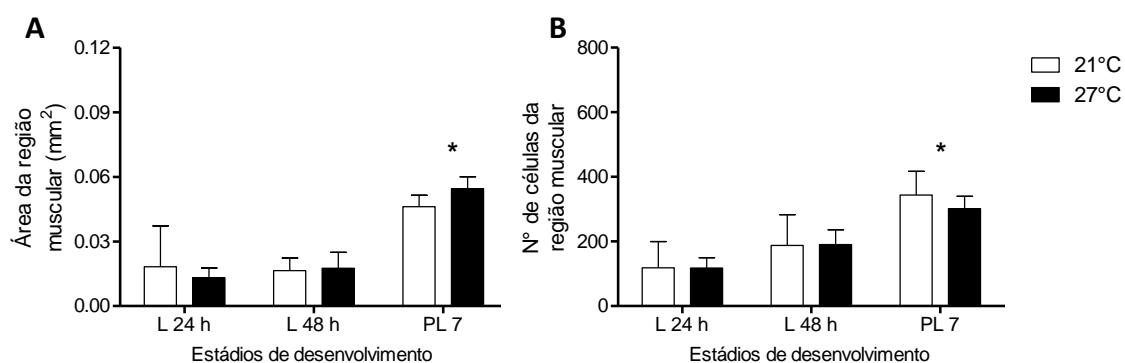


FIGURA 24 – Área muscular em mm² e número de fibras musculares totais das larvas de jundiá incubados a 21 e 27°C. A) A área total da musculatura esquelética está indicada em mm², B) o número total de células da região muscular total ao longo dos estádios experimentais (larva 24 hpe, larva 48 hpe e pós-larva 7 dpe). Barras brancas indicam média \pm desvio padrão de larvas incubadas a 21°C e as barras pretas média e desvio padrão daqueles incubados a 27°C. * indica diferença significativa entre as temperaturas.

Individualmente, as fibras musculares apresentaram maior área superficial nas larvas com 48 hpe à temperatura mais alta (27°C) ($782,57 \pm 289,99 \mu\text{m}^2$) que na mais baixa (21°C) ($701,80 \pm 286,11 \mu\text{m}^2$) (Fig. 25 A, Tab.4), não houve,

porém, diferença significativa na área dessas células nas pós-larvas incubadas nas duas temperaturas.

Nas larvas com 24 hpe, a densidade de fibras musculares foi maior a 27°C, sendo que a diferença não foi significativa nas larvas com 48 hpe. Contudo, a situação se inverteu nas pós-larvas, nas quais a densidade foi maior sob temperatura menor (21°C) (Fig. 25 B e Tab. 4).

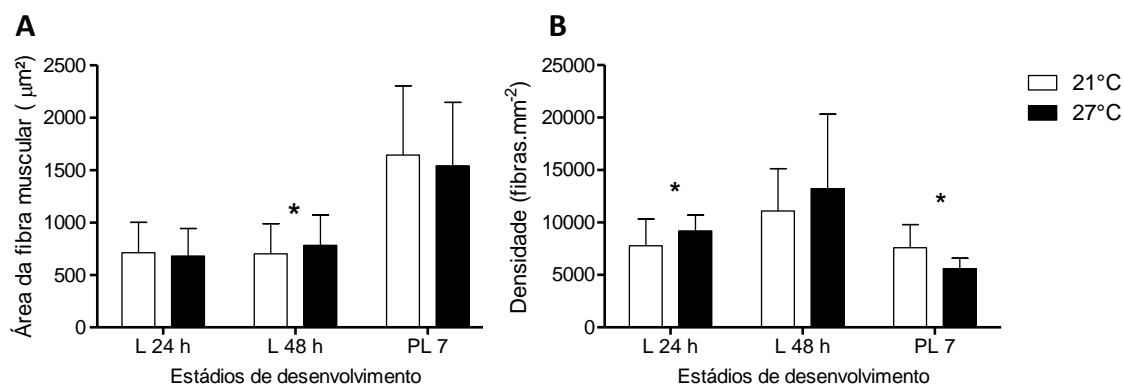


FIGURA 25 – Área das fibras musculares em μm^2 e densidade (fibras. mm^{-2}) das larvas de jundiá incubados a 21 e 27°C ao longo dos estádios experimentais (larva 24 hpe, larva 48 hpe e pós-larva 7 dpe). A) representa a área de cada célula muscular em μm^2 e em B) a densidade das fibras ao longo do desenvolvimento. Barras brancas indicam média e desvio padrão das larvas incubadas a 21°C e as barras pretas média e desvio padrão daquelas incubadas a 27°C. * indica diferença significativa entre as temperaturas.

Em todos os estádios analisados (eclosão, larva 24 hpe, larva 48 hpe e pós-larva 7dpe) e nas duas temperaturas testadas, verificou-se a presença das estruturas características do tecido muscular. Sob microscopia de luz, foi observado que as células musculares estriadas esqueléticas (fibra muscular) apresentam formato arredondado em secção transversal, núcleos periféricos característicos e estão circundadas por uma membrana plasmática (sarcolema). A estrutura da membrana plasmática não pode ser verificada através de microscopia de luz, contudo, observou-se o limite de cada célula, que indica a presença desta membrana. As fibras musculares apresentam um sarcoplasma reduzido devido a presença de grande quantidade de fibras musculares. Foi possível observar desde o estágio de eclosão (Fig. 26 A e B) a presença de uma fina camada de células superficiais formando a epiderme. A musculatura rápida e lenta podem ser facilmente distintas (Fig. 26). Tanto nas larvas 24 hpf, quanto nas larvas 48 hpf foram observadas a área de crescimento no extremo miotomal (Fig. 26 C, D, F e G). Também foi possível observar a área de crescimento da musculatura lateral rápida (Fig. 26 E e F). A área do corpo do peixe ocupada pela musculatura foi gradualmente

aumentando ao longo dos estádios em ambas as temperaturas. Foi observado um desenvolvimento gradual do arranjo muscular ao longo do tempo, mas não foram observadas diferenças entre as temperaturas analisadas. Esta progressão se evidenciou claramente entre os estádios de eclosão e seguindo cronologicamente até o estágio de pós-larva 7 dpe. Além disso, algumas estruturas ficaram mais evidentes ao longo dos estádios analisados, como por exemplo, o septo lateral horizontal o qual divide a musculatura em epaxial e hipoaxial (Fig. 26 C, D, E, F, G e H).

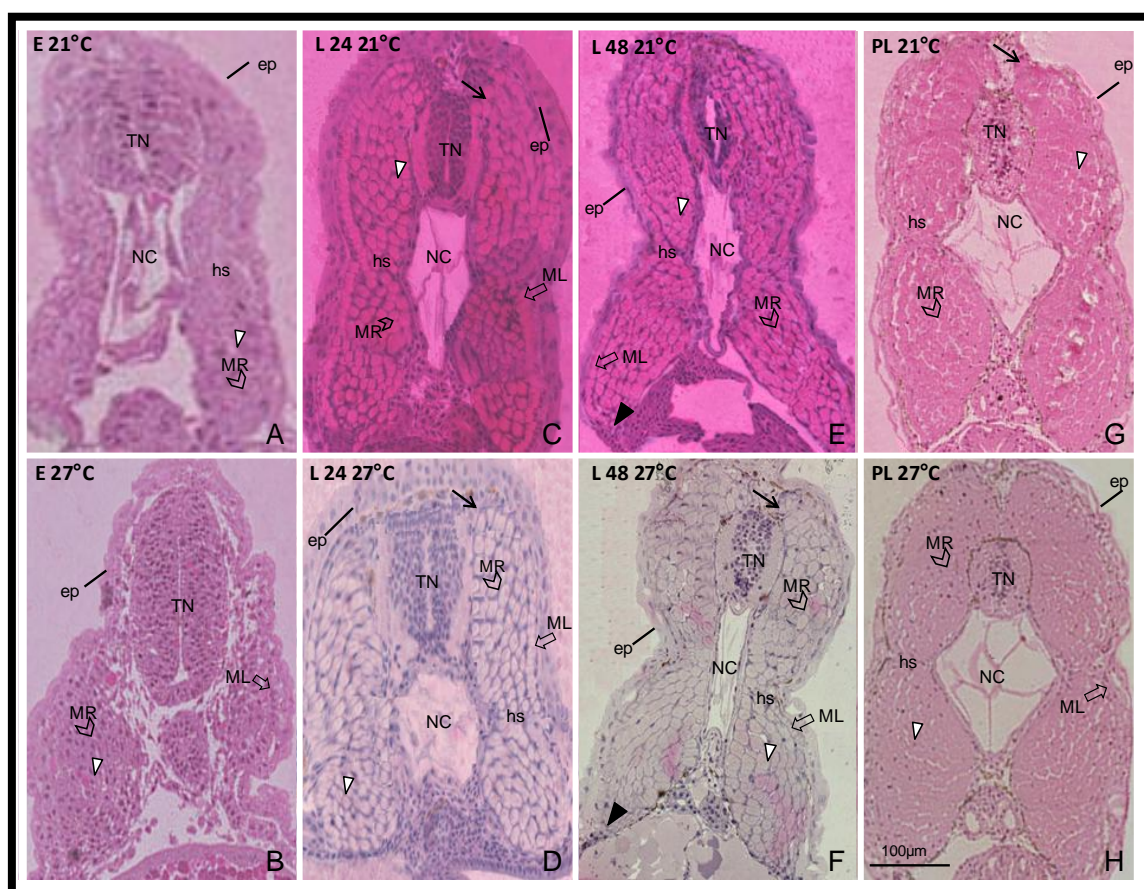


FIGURA 26 - Análise da estrutura muscular sob ML em secção transversal de larvas de *Rhamdia quelen* incubados a 21 e 27°C. As imagens A e B evidenciam o estágio de eclosão, C e D, representam larvas 24 hpe; E e F demonstram larva 48 hpe; G e H representam pós-larva 7dpe. Símbolos: ML= musculatura lenta superficial (músculo vermelho), MR= musculatura rápida profunda (músculo branco), NC= notocorda, TN= tubo neural, ep= epiderme, hs= septo lateral horizontal, seta= área de crescimento no extremo miotomal, cabeça de seta branca= fibra muscular, cabeça de seta preta= área de crescimento da musculatura lateral rápida. Escala: 100 µm.

Tabela 4 – Quadro resumo dos resultados observados neste estudo.

| Estádios | ML / MORFOMETRIA | | MET | | GAG | |
|------------|--|--|------------------------------------|------------------------------------|------------|------------|
| | 21° | 27° | 21° | 27° | 21° | 27° |
| E | - | - | < diâmetro fibra | > diâmetro fibra | - | - |
| L24 | < densidade | > densidade | - | - | - | - |
| L48 | > área fibra | > área fibra | - | - | sem DS | > DS/larva |
| PL7 | > densidade < área total > n° fibras | < densidade > área total < n° fibras | < diâmetro fibra < núcleo fibra | > diâmetro fibra > núcleo fibra | < DS/larva | > DS/larva |

FONTE: o autor.

5.2 ULTRAESTRUTURA DAS FIBRAS MUSCULARES

A análise das imagens transversais e longitudinais de microscopia eletrônica de transmissão demonstrou um desenvolvimento gradual do tecido muscular ao longo dos estádios do desenvolvimento. Contudo, somente entre os estádios extremos (eclosão e pós-larva 7 dpe) foi possível observar uma diferença sutil no grau de organização da musculatura esquelética em ambas as temperaturas. Em ambas as temperaturas, não foi possível observar células musculares nos embriões de 10 somitos e 25 somitos através das imagens obtidas, devido ao plano dos cortes.

Como demonstrado na Fig. 27, as larvas em estágio de eclosão apresentaram-se, ultraestruturalmente, em fase mais inicial do desenvolvimento muscular quando comparados às pós-larvas (Fig. 29, Tab. 4). Nestas larvas, os sarcômeros ainda estavam começando a se organizar, as mitocôndrias apresentaram-se em um arranjo bem diferente daquele observado no músculo diferenciado, ou seja, apresentaram-se de forma desorganizada ou com organização aparentemente aleatória, em um estágio mais precoce do desenvolvimento, assim como as miofibrilas, que se mostraram totalmente desorganizadas neste estágio (ainda não formaram sarcômeros). Ainda foi observado o retículo sarcoplasmático começando a se organizar, mas ainda sem o aspecto totalmente diferenciado (Fig. 27 A e B).

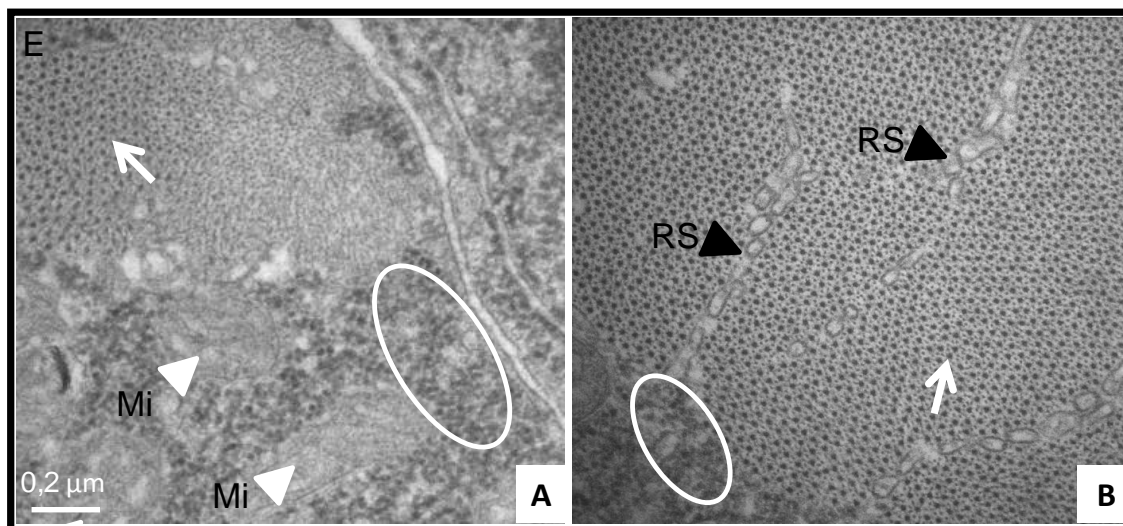


FIGURA 27 - Análise ultraestrutural de secção transversal em MET de músculo de jundiá. As imagens A e B evidenciam a fase de eclosão. A) seta branca demonstra os sarcômeros começando a se organizar, as cabeças de seta brancas mostram as mitocôndrias (Mi) dispersas no sarcoplasma. A área delimitada pelo elipse branca evidencia as miofibrilas desorganizadas, ou seja, não formando sarcômeros. B) as cabeças de seta pretas mostram o retículo sarcoplasmático (RS) começando a se organizar, a seta branca demonstra os sarcômeros começando a se organizar e a área delimitada pelo círculo branco mostra as miofibrilas desorganizadas. Escala: 0,2 μ m para ambas as imagens.

Comparando as imagens panorâmicas longitudinais das larvas e pós-larvas de jundiá, foi observada uma progressiva organização das tríades (Túbulos T e cisternas do retículo sarcoplasmático) (Fig. 28). Nos indivíduos mais jovens a organização apresentou-se mais difusa enquanto que nas pós-larvas 7 dpe a organização alcançou um nível maior.

Embora não tenha sido feita uma análise morfométrica em nível ultraestrutural, foi possível observar que o diâmetro entre as fibras foi progressivamente maior e a quantidade de sarcoplasma não apresentando sarcômeros foi progressivamente menor ao longo do tempo de desenvolvimento (Fig. 28, A, B, C e D, Tab. 4).

Analisando a diferença no sarcoplasma das fibras, foi possível verificar uma diferença entre as temperaturas testadas. Foi possível observar uma diferença na largura da fibra entre as temperaturas de 21 e 27°C tanto nas larvas recém eclodidas quanto nas pós-larvas 7 dpe, sendo maior à 27°C (Fig. 28, Tab. 4). Além disso, a área coberta pelo sarcoplasma entre as fibras foi menor nas pós-larvas 7 dpe em relação as larvas no estágio de eclosão, contudo houve uma diferença observada entre as temperaturas para as pós-larvas (27°C apresentou espaçamento maior (Fig. 28, imagem D).

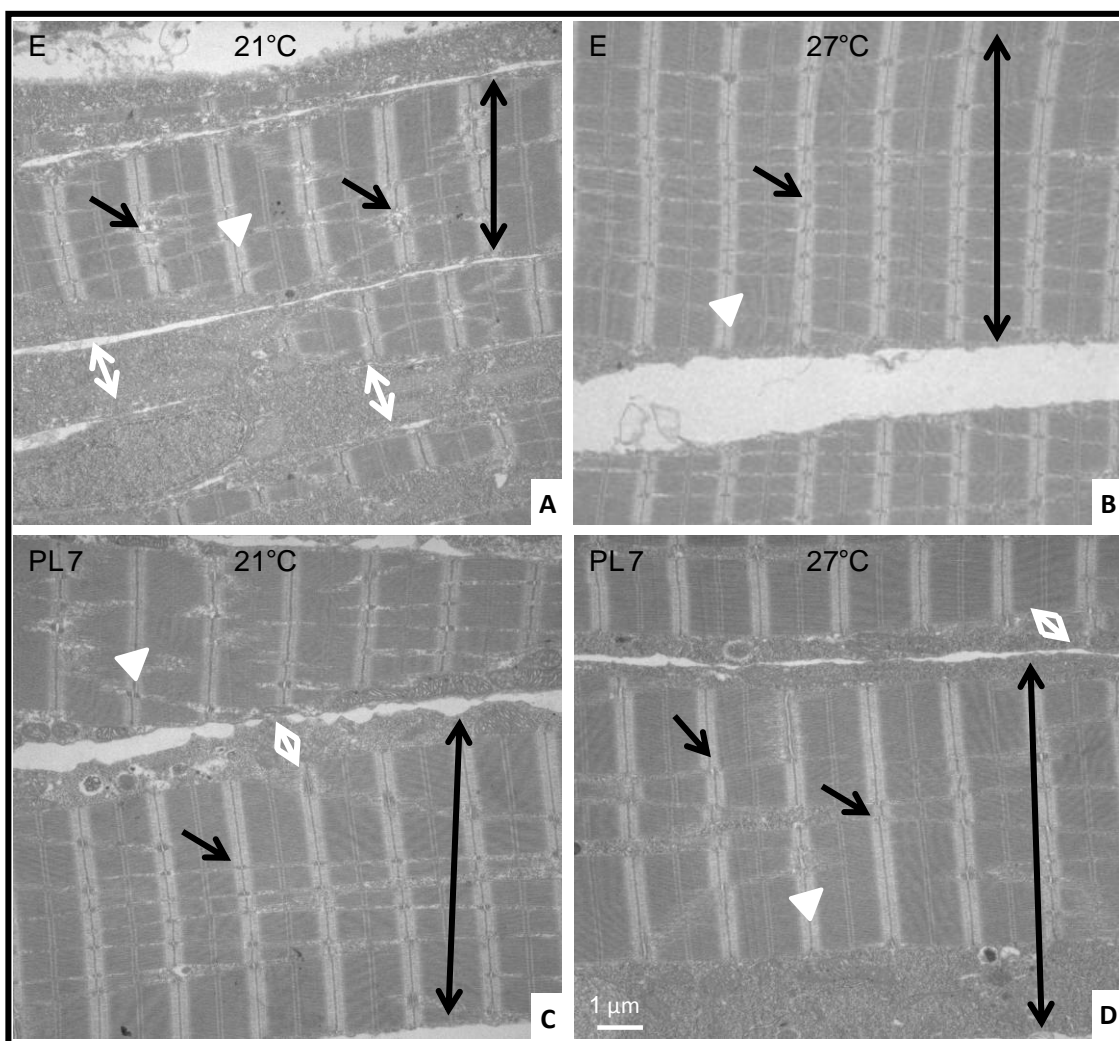


FIGURA 28 - Eletronmicrografias de transmissão de músculo de jundiá em secção longitudinal. As imagens A e B evidenciam a fase de eclosão a 21 e 27°C, respectivamente e C e D o estágio de pós-larva a 21 e 27°C, respectivamente. As setas pretas indicam a organização das tríades, as setas duplas brancas mostram o citoplasma da fibra entre os sarcômeros, as setas duplas pretas delimitam a largura da fibra muscular e as cabeças de seta brancas evidenciam os sarcômeros. Escala: 1µm para todas as imagens.

Observou-se, ainda, uma diferença no padrão de estriação clara e escura (Banda I e Banda A, respectivamente) entre as pós-larvas incubadas a 21 e 27°C, respectivamente, como evidenciado na Fig. 29 imagem A e B. As pós-larvas incubadas a 21°C apresentaram menos estriações claras e escuras quando comparadas aquelas incubadas a 27°C, as quais foi possível observar nitidamente um número maior destas estriações que indicam as Bandas I e A (Fig. 29, Tab.4). Além disso, as pós-larvas incubadas a 27°C apresentaram um diâmetro sutilmente maior que aquelas incubadas a 21°C.

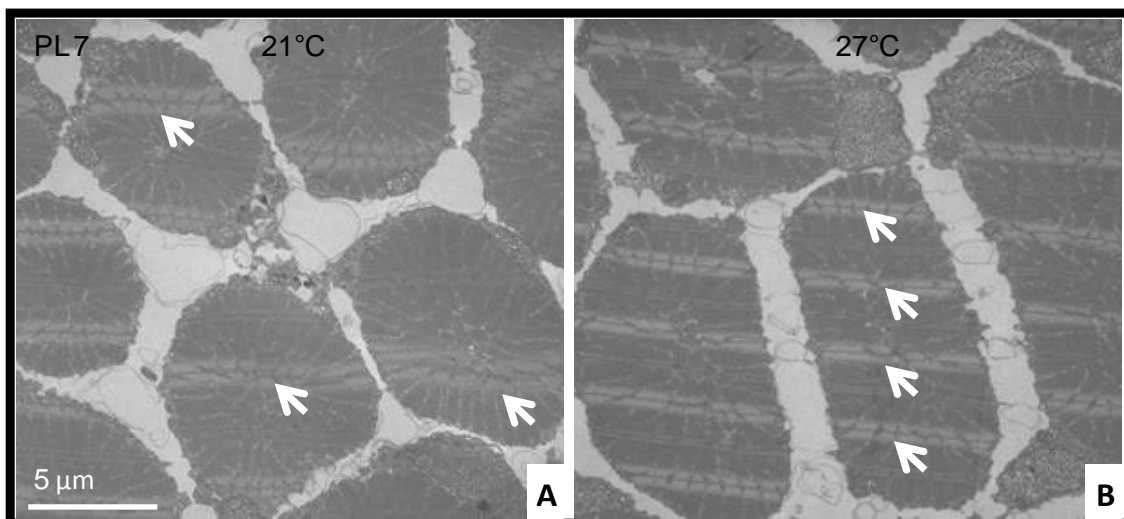


FIGURA 29 - Secção transversal sob MET de músculo de jundiá. As imagens A e B evidenciam a fase de pós-larva a 21 e 27°C. As setas brancas indicam as bandas I (claras) nas duas temperaturas experimentais. Escala: 5 µm.

Após a observação da proporção entre o núcleo, nucléolo e os feixes de fibras, foi possível verificar uma diferença ao longo do desenvolvimento, e, sobretudo, nos estádios mais iniciais apresentados neste estudo (eclosão), assim como, nos mais avançados (pós-larvas) entre as temperaturas de 21 e 27°C. Como apresentado na Fig. 30 A e B e Tab. 4, as larvas em estágio de eclosão apresentam um núcleo maior em relação à célula muscular total. Esta proporção foi se modificando ao longo do desenvolvimento até que a fibra muscular tenha aumentado de tamanho e o núcleo tenha se reduzido. Houve, contudo uma diferença de tamanho entre as células musculares e sutilmente também do núcleo observada entre as temperaturas de 21 e 27°C nas pós-larvas 7 dpe (Fig. 30 C e D).

Comparando as imagens dos diferentes grupos, foi possível perceber a diferença de diâmetro entre as células musculares (Fig. 30 B, D e F), assim como observado anteriormente na Fig. 29 e Tab. 4. A diferença de diâmetro das fibras foi diferente entre as temperaturas experimentais (21 e 27°C) no estágio de pós-larvas 7 dpe, como demonstrado na Fig. 30 D e F.

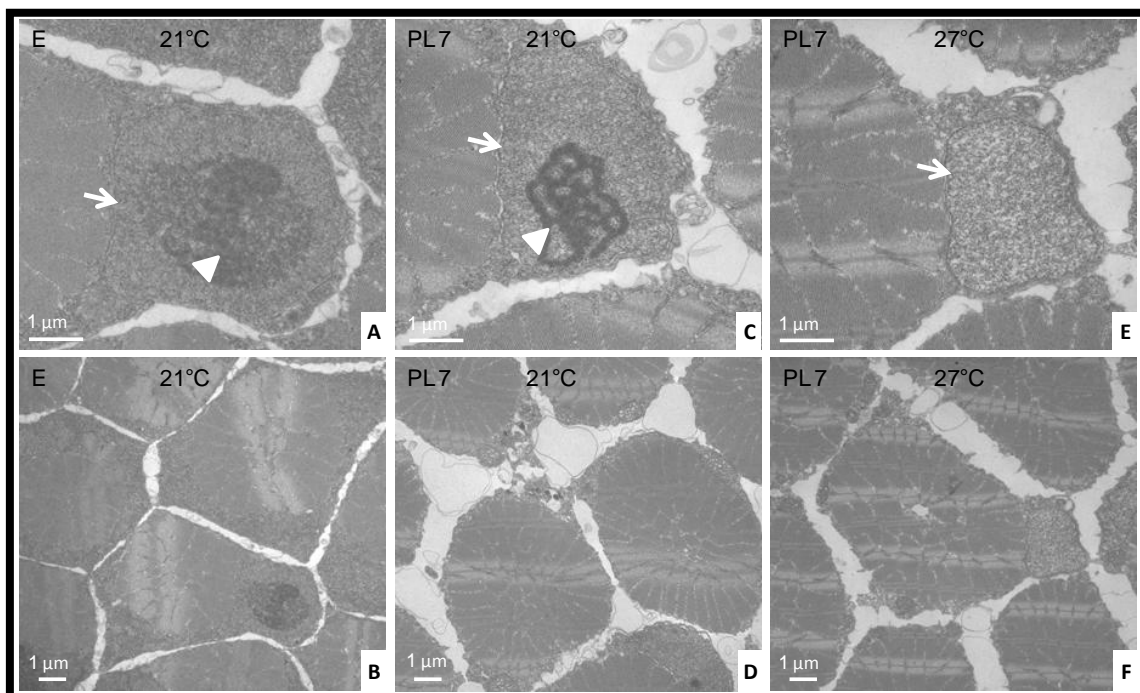


FIGURA 30 - Análise ultraestrutural de músculo de *Rhamdia quelen* em secção transversal. As imagens A e B evidenciam a fase de eclosão a 21°C, C e D o estágio de pós-larva a 21 °C e E e F pós-larvas incubadas a 27°C. As setas indicam o núcleo e as cabeças de seta o nucléolo em diferentes proporções ao longo dos estádios do desenvolvimento. Escala: 1 µm.

Através das imagens panorâmicas em secção longitudinal, conforme mostra a Fig. 31, observou-se a presença característica da unidade sarcomérica (**sarcômeros**) – a unidade contrátil básica do músculo estriado. Constatou-se que esta ultraestrutura está presente nas larvas e pós-larvas nos estádios de: eclosão (E), larva 24 horas após eclosão (L24 hpe), larva 48 horas após eclosão (L48 hpe), bem como no estágio pós-larva 7 dias (PL7 dpe) nas temperaturas impostas (21 e 27°C), mesmo que em níveis diferentes de organização conforme mencionado acima.

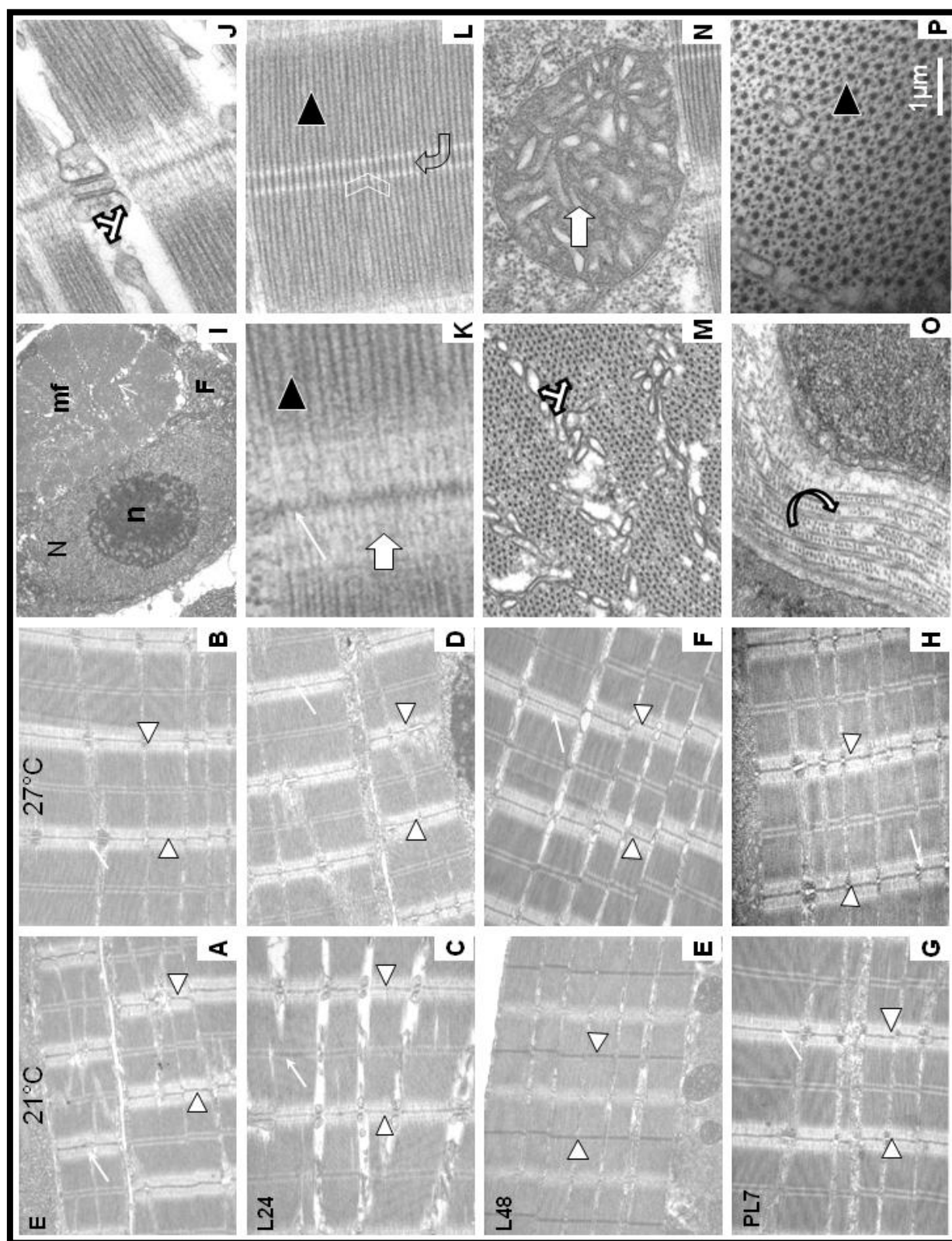


FIGURA 31- Análise ultraestrutural em MET de músculo em secção longitudinal e transversal de larvas e e pós-larvas de jundiá incubados a 21 e 27°C. As imagens A e B evidenciam a fase de eclosão, C e D, representam larvas 24 hpe; E e F demonstram larva 48 hpe; G e H representam pós-larva 7dpe. As eletronmicrografias A, B, C, D, E, F, G e H evidenciam a análise ultraestrutural dos sarcômeros em secção longitudinal e I, J, K, L, M, N, O e P evidenciam detalhes das principais ultraestruturas preservadas e presentes em todas as fases analisadas (I, M, P secção transversal e demais imagens em secção longitudinal). Símbolos: sarcômeros = ∇ , Linha Z - filamento intermediário = \rightarrow , Banda A miofilamentos de actina = \blacktriangle , Banca I - filamentos de miosina = \square , Linha M = ∇ , Banda H = \circ , mitocôndrias = \oplus , Túbulos T = \otimes , colágeno = \otimes , n = núcleo, nu = nucléolo, mf = miofibrila, F = fibra muscular. Escala: 1 μ m.

Nos estádios analisados (eclosão, larva 24 hpe, larva 48 hpe e pós-larva 7dpe), foi observado de forma nítida, que em todas as eletromicrografias panorâmicas da Fig. 31 o músculo está relaxado. Foram observadas as bandas isotrópicas ou **Bandas I**, compostas por microfilamentos de **actina**, com exceção da larva 48 hpe à 21°C (Fig. 31) na qual não foi observado esta banda I estando este músculo contraído. A integridade ultraestrutural da **Linha Z** foi verificada ao longo da análise de todos os estádios e em ambas as temperaturas experimentais. Pode-se observar de forma evidente em maior magnitude a preservação da Linha Z, a presença dos microfilamentos de actina e dos filamentos grossos de **miosina** na banca **Banda A** anisotrópica (imagem K, Fig. 31).

Foram observadas algumas ultraestruturas de forma semelhante em todos os estádios analisados a 21° e 27°C. Verificou-se, nas secções transversais, a presença de fibras musculares, nas quais se observou: as miofibrilas, bem como, periféricamente, o núcleo com o nucléolo evidente (Fig.31 imagem I). Este núcleo apresentou-se, predominantemente composto por eucromatina.

Ainda como característica do tecido muscular esquelético, foi possível verificar em todos os estádios amostrados (segundo indicado nas imagens em detalhes) em ambas as temperaturas a presença de **Túbulos T** ou transversais, no sarcoplasma, o citoplasma celular (imagens J e M, Fig. 31). Na imagem L da Fig. 31, foi observado, de forma evidente, a **Linha M** e a **Banda H**. Além disso, foi observada a presença de mitocôndrias com muitas cristas (imagem N Fig. 31). Pode-se observar ainda, na imagem “O” (Fig. 31), fibras de colágeno depositadas ao redor das fibras.

Finalmente, na eletromicrografia “P” em corte transversal (Fig. 31) foi possível verificar, nos estádios desenvolvimentais analisados a 21 e 27°C, os filamentos contráteis da unidade muscular, permitindo observar os filamentos espessos, circundados pelos filamentos finos.

5.3 IMUNOMARCAÇÃO DAS FIBRAS MUSCULARES

A análise do perfil de marcação de mioblastos, miócitos e miosina do tecido muscular durante o desenvolvimento larval e pós-larval empregando-se microscopia confocal foi realizada nos estádios de eclosão, larva 24 hpe, larva

48 hpe e pós-larva 7 dpe nas temperaturas de 21 e 27°C. Imagens dos embriões *in vivo* capturados no momento da amostragem nos estádios de: eclosão, larva 24 hpe, larva 48 hpe estão representadas na Fig. 32 para ilustrar a morfologia em cada estágio. Somente para as pós-larvas, com 7 dias após a eclosão, não foi possível obter imagem “*in vivo*” devido a intensa movimentação e tamanho das mesmas.

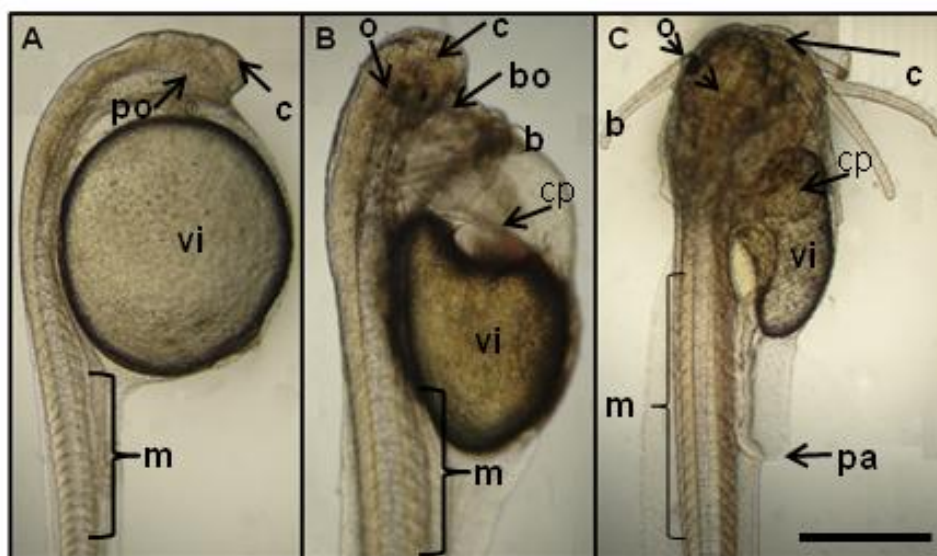


FIGURA 32 – Larvas e pós-larvas vivas de jundiá *R. quelen*. A) larva em estágio de eclosão, B) larva 24 hpe, e C) larva 48 hpe. Símbolos: vi= vitelo, cp= cavidade pericárdica, c= cabeça, po= placa óptica, pa= póro anal, m= musculatura, b= barbilhões, o= olhos, bo= boca. Escala: 500µm para todas as imagens.

Foi observado que o padrão de imunomarcacão demonstrado para os mioblastos empregando-se o anticorpo anti MyoD foram similares. Este evidenciou que em todos os estádios experimentais analisados e em ambas as temperaturas, foi obtida uma nítida imunomarcacão das células musculares em formação. O mesmo padrão foi observado nos estádios de eclosão a 21°C e larva 48 hpe nas temperaturas de 21 e 27°C, nos quais não foi obtido um bom foco das imagens e, desta maneira, as mesmas não foram apresentadas.

Pode-se observar na Fig. 33 onde se apresentou simultaneamente o perfil de marcação para o fator de regulacão miogênica MyoD (fator determinante de mioblasto) e também os núcleos celulares (marcados com DAPI), que a marcação obtida com o MyoD concentrou-se especificamente na área dos somitos (ou miótomos). As demais áreas morfológicas evidenciadas apresentam negatividade a esta marcação do fator de transcriçao MyoD, resultados estes observados para ambas temperaturas experimentais (21 e

27°C). Contudo, foi observado para o estágio de 10 somitos no qual não foi possível verificar nenhuma marcação para o fator MyoD com a respectiva técnica empregada (dados não mostrados).

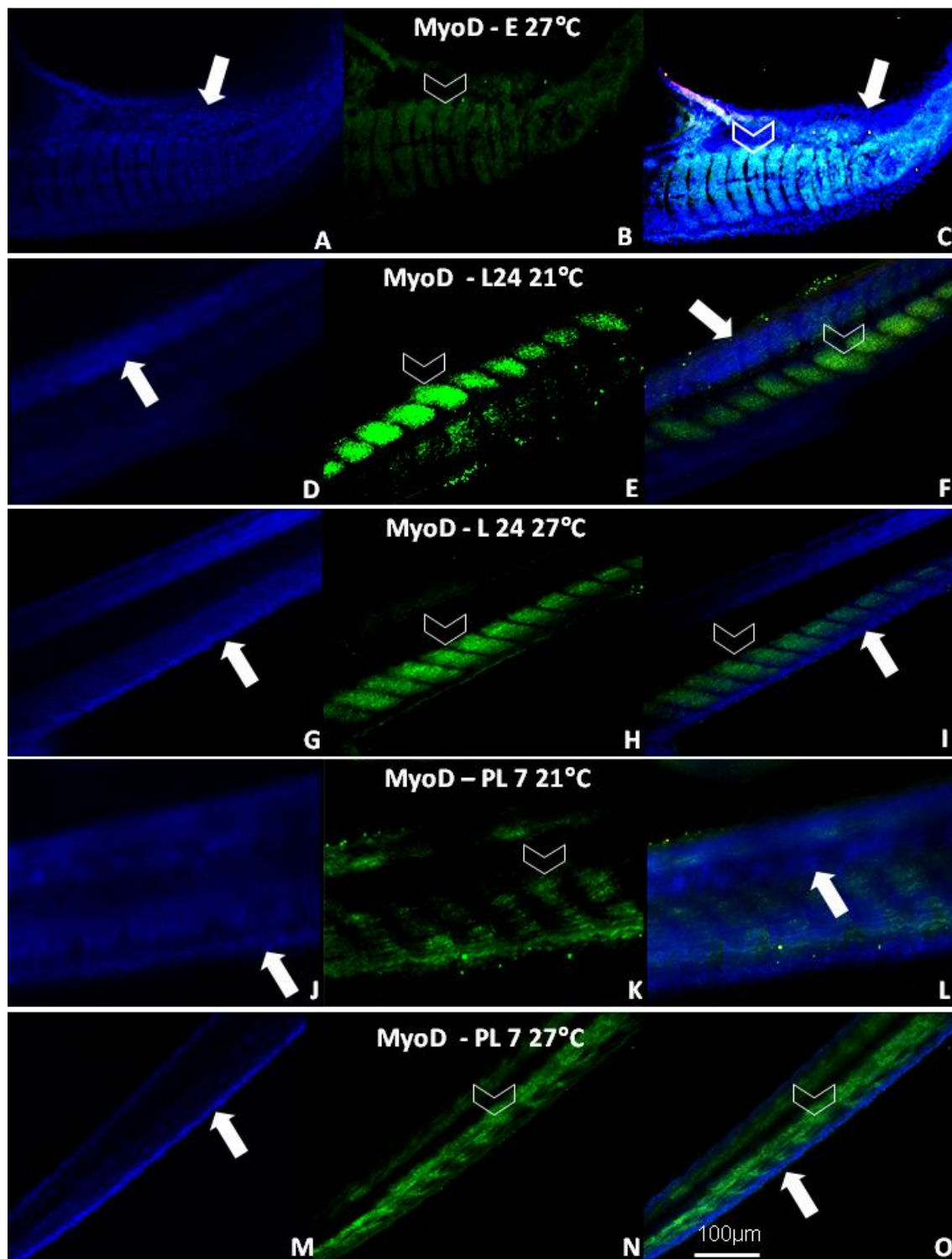


FIGURA 33 - Análise do perfil de marcação de mioblastos do tecido muscular durante o desenvolvimento larval e pós-larval de jundiá empregando-se microscopia confocal. As imagens A, D, G, J e M evidenciam o padrão de marcação com o intercalante nuclear DAPI. As Imagens B e C, H e I, N e O representam marcação para mioblastos empregando-se o anticorpo anti MyoD, e marcação para núcleo celular com DAPI para os estádios de eclosão, larva 24 hpe e pós larva de 7 dias dpe a 27°C, respectivamente. As Imagens E e F, K e L representam marcação para mioblastos empregando-se o mesmo anticorpo e marcador

nuclear para os estádios de larva 24 hpe, pós larva de 7 dpe a 21°C, respectivamente. Símbolos: seta = marcação de núcleos DAPI, cabeça de seta = marcação de MyoD. Escala: 100 µm.

Os resultados evidenciados na Fig. 34 na qual se empregou o anticorpo anti meromiosina (MF 20) detectou-se a miosina presente nas unidades sarcoméricas. Pode-se observar que em todos os estádios analisados (eclosão, larva 24 hpe, larva 48 hpe e pós-larva 7 dpe) e temperaturas impostas (21 e 27°C) a marcação concentrou-se nos sarcômeros.

As imagens de sobreposição do anticorpo anti meromiosina e da marcação nuclear DAPI reforçam a localização deste padrão de marcação estando concentradas nas unidades sarcoméricas. Foi observada marcação positiva, somente, para o glicosaminoglicano de ácido hialurônico (AH) nas imagens “F e I” (Fig. 34) no estágio de larva 24 hpe a 21°C e larva 48 hpe a 27°C, respectivamente. Pode-se notar que esta marcação se fez em forma de rede estando presente bordeando o corpo das larvas, bem como, direcionando-se para a área das nadadeiras. Este padrão em rede característico pode ser observado no detalhe da Fig. 34 (“in set” da imagem “F”). Podemos, aqui, supor que esta marcação não foi possível ser visualizada e registrada nos demais estádios estudados em virtude de se estar adquirindo as imagens não de um corte do material, mas sim dos embriões inteiros e mesmo que ao empregar o equipamento confocal, não nos foi possível observar as amostras em planos ópticos devidamente finos, inviabilizando a observação matricial destes compostos, dificultando tanto a visualização como a captura das imagens, sendo impossível empregar objetivas de maior ampliação pela espessura das amostras.

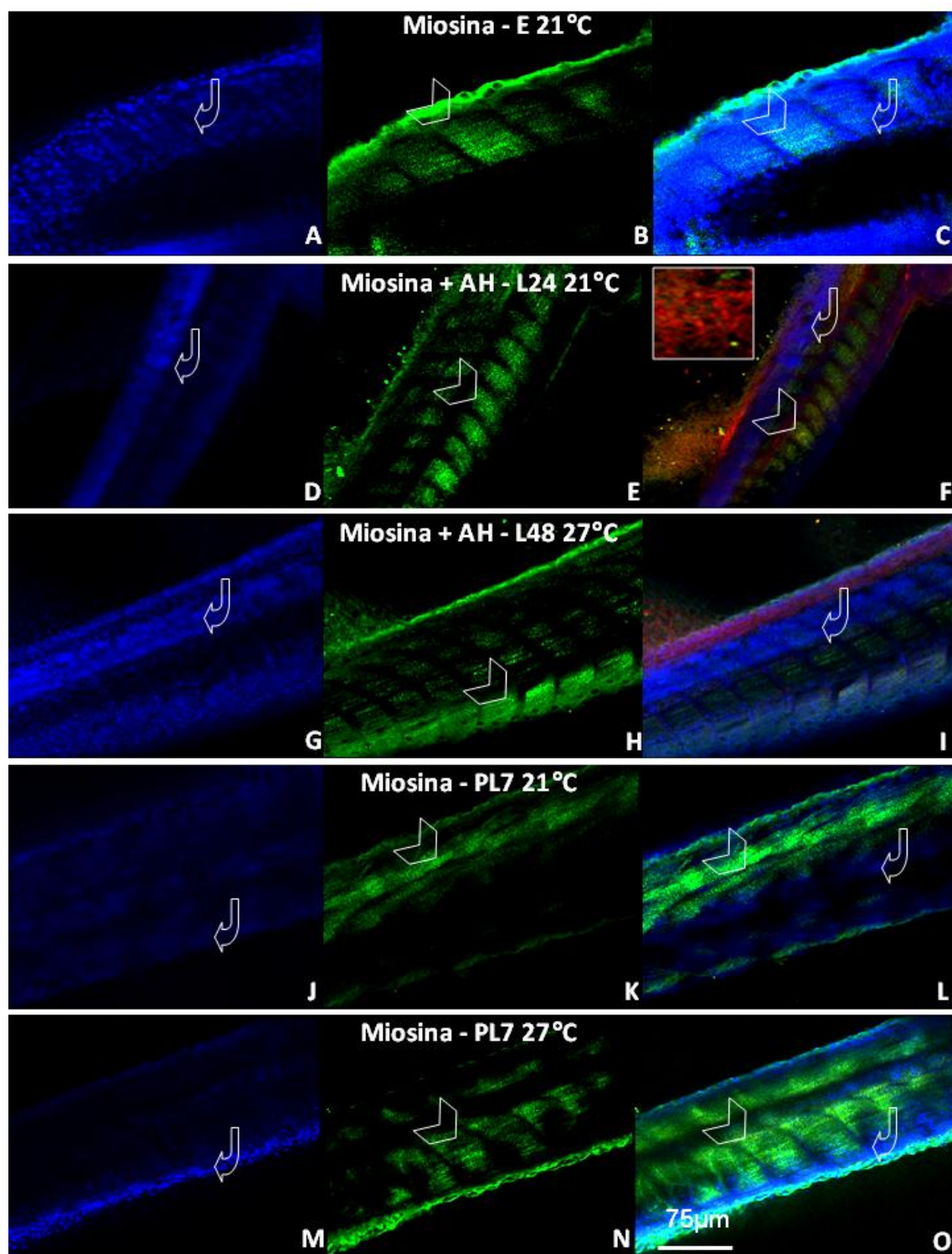


FIGURA 34 - Análise do perfil de marcação de miosina do tecido muscular durante o desenvolvimento larval e pós-larval de jundiá empregando-se microscopia confocal. As imagens A, D, G e J evidenciam detalhes da região muscular de larvas adquiridos em microscópio confocal com a marcação intercalante de núcleo DAPI. As Imagens B e C, E e F e K e L representam marcação para miosina empregando-se o anticorpo anti meromiosina e marcação para o núcleo celular empregando-se DAPI para o estágio de eclosão, larva 24 hpe e pós-larva de 7 dpe a 21°C, respectivamente. As Imagens H e I, N e O representam marcação para miosina empregando-se o mesmo anticorpo e similar marcação para evidenciar o núcleo celular para o estágio de larva 48 hpe e pós-larva de 7 dpe a 27°C, respectivamente. Símbolos: seta = marcação de núcleos DAPI, cabeça de seta = marcação de miosina, “in set” = marcação para Ácido Hialurônico (AH) (Texas-Red 594). Escala: 75 μm.

Os resultados observados na Fig. 35, na qual se empregou o anticorpo anti miogenina para detecção de mioblastos, demonstrou um padrão de marcação em agregados imunomarcados dispostos ao longo do corpo dos espécimes em áreas que coincidem com a área de musculatura esquelética de larvas de jundiá. Esta marcação evidenciou algumas regiões específicas da grande amplitude dos somitos, não os somitos como um todo.

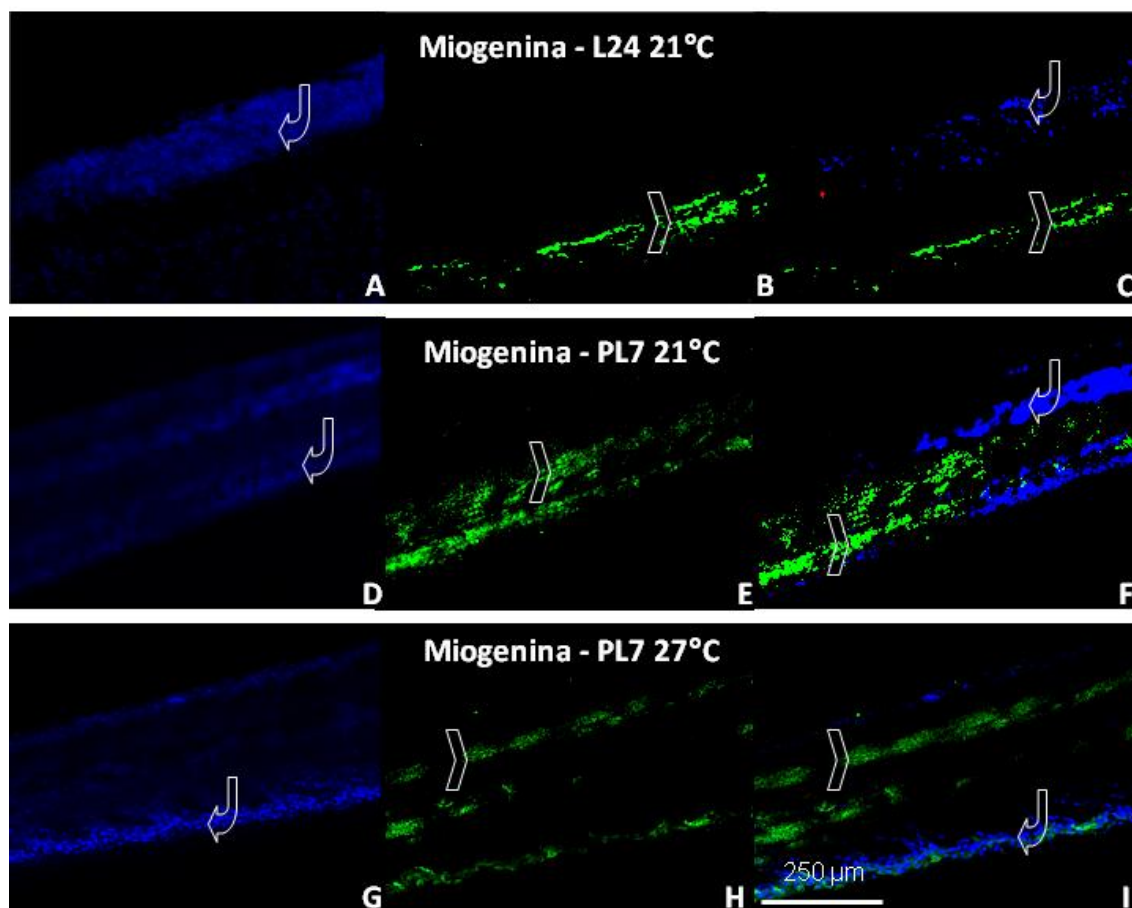


FIGURA 35 - Análise do perfil de marcação de mioblastos do tecido muscular durante o desenvolvimento larval e pós-larval de jundiá empregando-se microscopia confocal. As imagens A, D e G evidenciam o padrão de marcação de embriões e larvas com intercalante de DNA DAPI na região muscular de jundiá *R. quelen*. As Imagens B e C, E e F representam marcação para mioblastos empregando-se o anticorpo anti miogenina, e marcação para o núcleo celular empregando-se DAPI para os estádios larva 24 hpe e pós-larva 7 dpe a 21°C, respectivamente. As Imagens H e I representam marcação para miócitos empregando-se o mesmo anticorpo e similar marcação para evidenciar o núcleo celular para o estágio de pós-larva de 7 dpe a 27°C. Símbolos: seta = marcação de núcleos DAPI, cabeça de seta = marcação do anticorpo anti-miogenina. Escala: 250 µm.

5.4 GLICOSAMINOGLICANOS

A análise das frações de GAGs obtidas à partir das amostras de *Rhamdia quelen* incubadas a 21 e 27 °C nos estádios de 10 somitos, 18 somitos, 25 somitos, eclosão, larva 24 hpe, larva 48 hpe e pós-larva 7 dpe mostraram uma

tendência a influência da temperatura, quando observados os estádios larva 48 hpe e pós-larva 7 dpe.

A eletroforese em gel de agarose revelou bandas de GAGs homogêneos para os estádios de larva 48 hpe (27°C) e pós-larva 7dpe (21 e 27°C) (Fig. 36). Porém, a temperatura de 27°C, foi possível observar uma maior quantidade do GAG dermatan sulfato (0,68 µg e 5,08 µg, L48 hpe e PL7 dpe, respectivamente). Essas frações, quando comparadas aos padrões de GAGs, apresentaram um perfil eletroforético semelhante à mobilidade de corrida do Dermatan sulfato (Fig. 36), sugerindo que este GAG esteja em maior quantidade em larvas e pós-larvas (L48 e PL7) de jundiá incubados a 27°C. As larvas (0,034 µg. larva⁻¹) e pós-larvas (0,254 µg. larva⁻¹) incubadas a temperatura mais alta (27°C) mostraram-se mais ricas em GAGs quando comparada aquelas incubadas a 21°C (0 e 0,026 µg. larva⁻¹ de L48 hpe e PL 7 dpe, respectivamente) (Fig. 37). Vale ressaltar que Heparan Sulfato, um outro glicosaminoglicano, possui distribuição ubíqua, isto é, presente em todas as células animais. Assim, a não observação deste GAG ou de outros (como o Condroitin Sulfato) nas outras amostras, mostra que a quantidade amostral não foi suficiente para avaliar de forma precisa, mas aponta para o Dermatan Sulfato como o glicosaminoglicano de maior produção nas amostras L48 hpe e PL7 dpe.

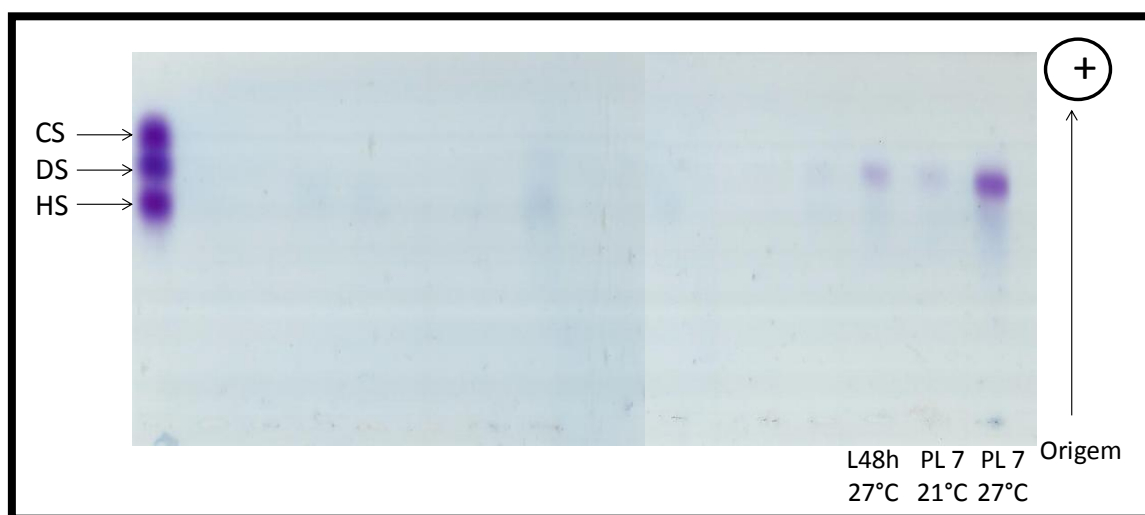


FIGURA 36 – Análise dos Glicosaminoglicanos separados por eletroforese em gel de agarose. As frações (L48 hpf 27°C e PL 7 dpe 21 e 27°C) foram degradadas, conforme discutido em Materiais e Métodos e, então, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, tampão 1,3 Diaminopropano-acetato (PDA). Uma mistura padrão, contendo 5 µg de condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparan sulfato (HS) foram aplicados na primeira amostra e, ao final o gel foi seco e, então, corado com azul de toluidina a 0,1%.

Neste estudo, a extração dessas macromoléculas no jundiá denota a presença de GAGs, contudo a sensibilidade do método não permitiu que fossem observadas com eficiência uma quantidade suficiente para detecção e quantificação nos demais estádios do desenvolvimento. Amostras em estádios mais iniciais do desenvolvimento, como, por exemplo, estádios de 10 somitos, 18 somitos, 25 somitos, eclosão e até mesmo as larvas 24 hpe não apresentaram quantidade significativa de GAGs para que fosse detectado pelo método ou não apresentam expressão destas moléculas.

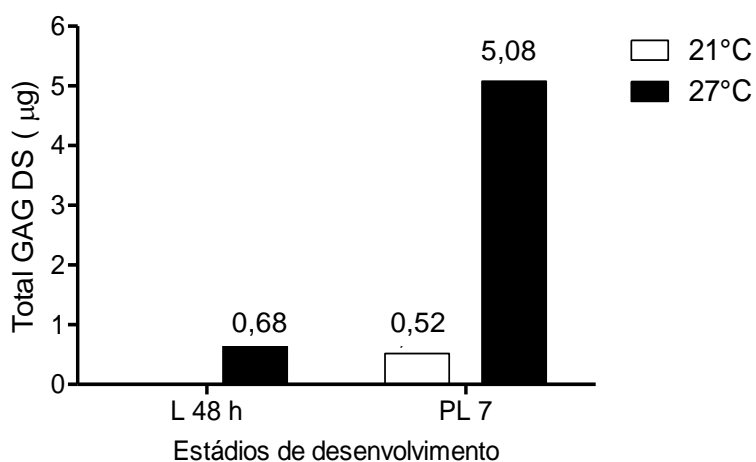


FIGURA 37 – Quantidade de GAG DS em µg nas larvas e pós-larvas de jundiá incubados a 21 e 27°C. Barras brancas indicam quantidade total de DS nas larvas 48 hpe e pós-larvas 7 dpe incubados a 21°C e as barras pretas aqueles incubados a 27°C. Valores em cima das barras indicam quantidade de DS em µg por indivíduo.

6 DISCUSSÃO

O crescimento corporal de peixes teleósteos, avaliado através do tamanho das fibras musculares esqueléticas, pode ser afetado pela temperatura da água. A partir das análises realizadas neste estudo, através das técnicas empregadas, pode-se concluir que houve uma organização progressiva no padrão de desenvolvimento das células musculares de larvas e pós-larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) a 21 e 27°C analisadas sob microscopia de luz, assim como sob microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, houve uma diferença significativa no padrão de crescimento avaliado pela área total muscular em secção transversal de jundiá nas pós-larvas 7 dpe entre as temperaturas testadas. Sendo que as pós-larvas a 27°C apresentaram maior área transversal e menor número total de células por larva, refletindo em menor densidade celular. Assim, como observado anteriormente por Rodrigues-Galdino (2009) houve uma diminuição da densidade das fibras com o aumento da temperatura nas pós-larvas incubadas à 21 e 27°C. Outros fatores, como por exemplo, o exercício físico, são conhecidos por estimular a hipertrofia muscular em peixes (JOHNSTON e MOON, 1980).

O crescimento hipertrófico pode ser observado, neste estudo, nas larvas 48 hpe, as quais apresentaram fibras mais espessas a 27°C quando comparadas as de 21°C. Este evento pode ter ocorrido devido à retomada no metabolismo e crescimento após adaptação da natação e busca por alimento.

Os presentes resultados corroboram com outros estudos, como por exemplo, com *Clupea harengus* (JOHNSTON et al., 1998), *Salmo salar* (JOHNSTON et al., 2003) e *Gadus morhua* (JOHNSTON e ANDERSEN, 2008). Para o bacalhau (*Gadus morhua*), não houve diferença significativa entre os dois parâmetros analisados (diâmetro e número de fibras) em larvas eclodidas a 4 e 7°C, entretanto o tratamento a temperatura mais alta (10°C) resultou em mais fibras musculares (JOHNSTON e ANDERSEN, 2008). Em *Clupea harengus*, o número de fibras musculares dos juvenis foi maior a 12°C que a 5°C (JOHNSTON et al., 1998), mostrando que a temperatura afeta o desenvolvimento muscular de peixes.

A organização tecidual, celular e subcelular, em especial a formação dos sarcômeros ocorreu de modo semelhante a 21 e 27°C. Assim como a expressão das proteínas analisadas (MyoD, miogenina e miosina) também não

foi alterada pela temperatura ao longo dos estádios do desenvolvimento. Tal resultado mostra que está havendo miogênese e que a mesma não está sendo modulada pela temperatura.

Na larva 24 hpe, a maior densidade de fibras a 27°C pode ser um indicativo de maior crescimento hiperplásico durante o período embrionário e/ou início do período larval (até 24hpe). Rodrigues-Galdino (2009) verificou menor taxa de crescimento relativo entre o período de gástrula e pós-larva (7 dpe) quando incubados em 21°C, em comparação com 27°C.

No entanto, as larvas incubadas a 27°C apresentaram fibras mais espessas que a 21°C. Essa espessura se iguala nas pós-larvas. Porém, Rodrigues-Galdino (2009) verificou que após 30 dias de incubação os juvenis de jundiá apresentam fibras mais espessas que a 21°C.

Embora a área das fibras das pós-larvas (7 dpe) tenha sido semelhante sob as duas temperaturas a densidade das fibras foi maior a a área do corpo ocupada por musculatura esquelética (em secção transversal) foi maior na temperatura mais alta. Esses resultados sugerem que a espessura da fibra é diretamente proporcional à temperatura. A semelhança entre a área das fibras nas pós-larvas do presente estudo pode ter sido reflexo de variação na amostragem.

A larva de *Rhamdia quelen* eclode com células musculares em processo de diferenciação, apresentando sarcômeros aparentemente funcionais, porém em menor número, ou seja, ocupam uma proporção menor do sarcoplasma do que em uma fibra muscular madura. Resultado evidenciado através da microscopia eletrônica de transmissão e confirmado por análises imunohistoquímicas pela expressão de miosina em todos os estádios analisados e presente nas unidades sarcoméricas. Além disso, os embriões de jundiá realizam contrações musculares ainda no período de segmentação, o que corrobora o fato de apresentarem sarcômeros funcionais no momento da eclosão (RODRIGUES-GALDINO et al., 2010).

Durante o período larval ocorreu um espessamento muscular evidenciado pela análise da área da fibra muscular, a qual foi significativamente maior na temperatura mais alta nas larvas 48 horas após a eclosão, e mostrando uma tendência à diminuição também nas pós-larvas incubadas a 27°C. As eletronicografias mostraram progressivamente um aumento na formação de sarcômeros e túbulos T. Além disso, a expressão dos MRFs MyoD e

miogenina, que são fatores que determinam a proliferação e diferenciação dos mioblastos (RESCAN, 2001; WATABE 1999, 2001), em todos os estádios analisados confirma os dados apresentados acima.

Os resultados obtidos tanto no presente estudo, quanto disponíveis na literatura (BARILLET et al., 2010) demonstram que análises utilizando microscopia eletrônica de transmissão mostram arranjo regular dos sarcômeros, com aparência estriada regular, demarcados por duas linhas Z vizinhas (linhas escuras) constituídas por bandas isotrópicas (bandas I, em torno da linha Z) e anisotrópicas (bandas A). Esta ultraestrutura foi observada nos embriões e larvas desde o momento da eclosão até no estádio de pós-larva (7 dpe) em ambas as temperaturas (21 e 27°C). Porém, não foi possível, observar células musculares nos embriões de 10 somitos e 25 somitos através das imagens obtidas em ambas as temperaturas, o que torna necessário maiores análises para que se compreenda detalhadamente como ocorre a formação do músculo no jundiá, uma vez que já é sabido que as contrações musculares iniciam-se nos embriões de 18 somitos (RODRIGUES-GALDINO, 2010).

Foram observadas ultraestruturas características de forma semelhante em todos os estádios analisados a 21° e 27°C, como a presença de fibras musculares, as miofibrilas e o núcleo com o nucléolo evidente. Este núcleo apresentou-se, predominantemente composto por eucromatina, que é uma característica de células ativas com intensa biossíntese, fenômeno que corresponde ao período de desenvolvimento embrionário e larval no qual há crescimento e formação de diversas estruturas.

Existem evidências que apontam para uma correlação positiva entre a taxa de síntese protéica e a concentração de RNA nos tecidos, bem como com a razão RNA:proteína (HOULIHAN, 1991; HOULIHAN et al., 1993). A razão RNA:Proteína indica que há síntese protéica e resultados apresentados por Rodrigues-Galdino (2009) mostraram que esta razão apresentou-se maior a temperaturas mais altas (27°C e 30°C) e menor nas temperaturas mais baixas (21°C e 24°C), o que pode explicar a presença de grande quantidade de eucromatina no núcleo das células musculares de jundiá.

Ainda sobre a análise ultraestrutural, foi observada a presença de mitocôndrias com muitas cristas. Estas organelas são responsáveis pela sintetização do fosfato de creatina, que, por sua vez, transporta grupos fosfato

entre a mitocôndria e a miofibrila para restabelecer os níveis de ATP (energia utilizada durante a interação da miosina com a actina) necessários durante a contração muscular (KIERSENBAUM, 2008). Pode-se observar, ainda, grande quantidade de deposição de colágeno organizado ao redor das fibras o que demonstra o grau de organização encontrado já nos estádios iniciais à eclosão em ambas as temperaturas.

Johnston e colaboradores (2009) e Malek e colaboradores (2004), através de seus estudos, concluíram que a temperatura de incubação pode alterar a expressão de vários fatores reguladores miogênicos, como a família MyoD (Myf5, MyoD, miogenina e MRF4). MyoD (age na proliferação dos mioblastos) e Myf5 e miogenina (age na proliferação dos mioblastos) (KOBIYAMA et al., 1998; WATABE, 1999), são fatores a serem expressos para atuarem no controle de mioblastos e proliferação de células satélites durante o desenvolvimento e crescimento do músculo (WEINTRAUB, 1993). Além disso, Barresi e colaboradores (2001) em estudo com zebrafish (*Danio rerio*) sugeriram que, após 24 horas, existem células precursoras miogênicas, representadas pelo fator de transcrição MyoD, nos extremos dorsal e ventral do miótomo, as quais originarão novas fibras musculares lentas. Através da análise da expressão dos fatores regulatórios miogênicos (MyoD e miogenina) pode-se observar que os mesmos estão sendo expressos desde a eclosão até o período pós-larval. O que significa que há presença de mioblastos e que os mesmos estão atuando na miogênese normalmente em ambas as temperaturas. Os resultados apresentados por Mareco (2012) mostraram que houve uma elevada expressão de MyoD em tilápia do Nilo cultivados a 22° C é a mais alta em tilápia do Nilo comparados a 30°C, porém os níveis de expressão de miogenina permaneceram constantes em todas as temperaturas experimentais. Segundo Mareco (2012) estas diferenças indicam que a miogenina age controlando o crescimento muscular de maneira parcial e que muito provavelmente, ela atua em níveis basais de diferenciação. Além disso, outros fatores de crescimento podem agir para que haja manutenção do fenótipo do músculo (AMALI et al., 2004), como a miostatina, que é um regulador negativo do crescimento muscular, agindo de maneira a controlar o crescimento inibindo a expressão de MyoD e, conseqüentemente, inibindo a proliferação de mioblastos (MC PHERON et al., 1997).

Knight e colaboradores (2011) em estudo (utilizando anticorpo anti-meromiosina e anti-MyoD) mostrando o desenvolvimento de músculos da cabeça do zebrafish (*Danio rerio*), observaram que a expressão de miosina e MyoD na musculatura craniofacial de zebrafish em desenvolvimento, apresenta o mesmo padrão de marcação verificado no presente estudo.

No estudo de duas proteínas reguladoras miogênicas (MyoD e miogenina) juntamente com análises de expressão de cadeia pesada de miosina (meromiosina), utilizando imunohistoquímica, em diferentes classes de mioblastos em cultura e *in vivo* de camundongos durante a miogênese inicial, revelou a presença, *in vitro*, de MyoD (durante a fase de proliferação dos mioblastos), seguido pela expressão conjunta de MyoD e miogenina e posteriormente o aparecimento de miócitos diferenciados e miotubos expressando miosina de cadeia pesada. Estes resultados sugerem que as diferenças fenotípicas entre as células miogênicas e as fibras, tanto *in vivo* ou *in vitro*, não dependem da expressão de MyoD ou miogenina, mas podem sim, estar relacionados com a expressão de outros fatores reguladores miogênicos, tais como Myf5 ou MRF4 ou por outros genes de regulação ainda não identificados (CUSELLA-DE ANGELIS et al., 1992). Evidência esta que pode explicar o presente resultado para a expressão semelhante dos fatores regulatórios miogênicos MyoD e miogenina.

O conhecimento a respeito dos GAGs, especialmente dos presentes em peixes, ainda é escasso na literatura (DELLIAS et al., 2004; MANSOUR et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009b; 2011; SOUZA et al., 2007b). Desta maneira, a investigação destas moléculas poderá ajudar a compreender melhor a hipótese de seu papel biológico na imunidade inata desse grupo de vertebrados e tendo em vista o crescimento da piscicultura no mundo, como em qualquer sistema intensivo de cultivo, que exige o controle sanitário da produção através do monitoramento de doenças (RODRIGUES et al., 2011).

Neste estudo foi verificado a presença do GAG dermatam sulfato nas larvas 48 horas após a eclosão a 27°C e nas pós-larvas em ambas as temperaturas experimentais, indicando que a produção desta molécula inicia-se mais tardiamente no desenvolvimento, ou pelo menos apresenta-se em maior concentração, e que está sendo modulada pela temperatura, uma vez que a dosagem obteve uma quantidade bem maior de DS na temperatura mais alta. Outra hipótese é que o método utilizado não teve sensibilidade para detectar a

presença de GAGs em estádios mais iniciais (devido a quantidade amostral e a composição biomolecular dos embriões e larvas), sendo necessárias maiores análises que elucidem este resultado. Recentemente, Zhang e colaboradores (2009) mostram que é possível avaliar a produção de GAG nos diferentes estágios de evolução de Zebrafish, utilizando técnicas de RNM, metodologia que poderia ser utilizada para avaliar as amostras utilizadas no presente trabalho com maior precisão trazendo informações à respeito da dosagem destes GAGs nos estádios mais iniciais .

Segundo Rodrigues e colaboradores (2012) o estudo dessas biomoléculas contribui para melhor compreensão dos mecanismos de defesa inata em peixes, levando em consideração o crescimento da piscicultura. Além disso, a análise de GAGs também pode servir como uma ferramenta de avaliação e monitoramento do estado de saúde e resistência em peixes, favorecendo o desenvolvimento de estratégias de manejo profilático mais eficientes relacionados com a aquicultura (RODRIGUES et al., 2011). Assim como neste estudo, o DS tem sido o GAG mais encontrado em vertebrados marinhos adultos, como nas raias *Dasyatis americana* e *D. guttata* (DELLIAS et al., 2004) e do tubarão azul *Prionace glauca* (NANDINI et al., 2005) e na enguia elétrica *Electrophorus electricus*, (SOUZA et al., 2007a) e sua função tem sido descrita, nestes trabalhos, principalmente como anticoagulante.

Em suma, os presentes resultados demonstraram que a temperatura de 21 e 27°C afetou o crescimento de larvas e pós-larvas de *R. quelen*, resultando em alterações na celularidade muscular. Entretanto não afetou a expressão dos fatores regulatórios miogênicos MyoD e miogenina, nem mesmo a proteína muscular miosina, pelo menos com as técnicas e nos estádios analisados. A incubação de *R. quelen* a 27°C, resultou em espécimes com fibras musculares maiores, mais espessas nas larvas de 48 hpe, indicando crescimento predominantemente hipertrófico, e maior quantidade do GAG dermatam sulfato na temperatura mais alta (27°C) em ambos os estádios observados (larva 48 hpe e PL 7 dpe) o que indica a atividade proliferativa. Esses resultados podem contribuir para melhoria da larvicultura desta importante espécie nativa de crescente interesse comercial.

7 CONCLUSÕES

Considerando as condições em que foram realizados os presentes experimentos, foi possível concluir que:

- 1) Houve diferença na taxa de desenvolvimento das células musculares das pós-larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) entre as temperaturas experimentais (21 e 27°C) através das análises de microscopia de luz e MET, sendo que a 27°C as pós-larvas obtiveram maior área total, menor quantidade de células, porém células mais espessas.
- 2) O padrão de imunomarcacão para cada marcador molecular - sendo os mioblastos (MyoD), sarcômeros (miosina) e a detecção de mioblastos diferenciando-se em miotubos (miogenina) - foi semelhante entre as temperaturas e estádios do desenvolvimento observados. Sendo que, em todos os estádios experimentais analisados e em ambas as temperaturas, foi obtida uma nítida imunomarcacão das células musculares em formação.
- 3) Foi observada a presença do GAG dermatam sulfato nas larvas 48 hpe e pós-larvas 7 dpe nos indivíduos incubados a 27°C, sendo que na temperatura mais alta houve uma maior quantidade deste GAG nas pós-larvas.

Segundo os dados apresentados neste estudo, a melhor temperatura de cultivo é de 27°C, uma vez que a esta temperatura as pós-larvas obtiveram maior área total de fibras musculares, assim como fibras mais espessas.

Ademais, as informações geradas neste estudo contribuíram para enriquecer o conhecimento sobre a biologia do desenvolvimento de peixes e para o melhor entendimento do efeito das condições ambientais no desenvolvimento animal, podendo contribuir para melhoria da larvicultura desta importante espécie nativa de crescente interesse comercial, uma vez que embriões incubados a 27°C se desenvolveram mais rapidamente e obtiveram um crescimento maior, corroborando com dados de Rodrigues-Galdino (2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTOR, J.K. *Imunologia e Microbiologia*. Rio de Janeiro, Elsevier, 183p, 2007.
- AGUIAR, D.H. BARROS, M. M., PADOVANI, C.R. PEZZATO, L.E. DAL PAI-SILVA, M. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *Journal of fish Biology*, v. 67, p. 1-12, 2005.
- ALAMI-DURANTE, H. FAUCONNEAU, B. ROUEL, M. ESCAFFRE, A.M. BERGOT, P. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to growth rate. *Journal of fish Biology*, v. 50, p. 1285-1302, 1997.
- ALEXANDER, R. The orientation of muscle in the myomeres of fishes. *Journal Marine Biology Association*, v. 49, p. 263-290, 1969.
- AMALI, A.A. LIN, C.J.F. CHEN, Y.H. WANG, W.L. GONG, H.Y. LEE, C.Y. Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, v.229, p.847-56, 2004.
- ANDRADE, M.L.L. Identificação do CD44, um receptor para ácido hialurônico, em oócitos e embriões caprinos (*Capra hircus*). Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 75 p, 2007.
- ARAÚJO, A.A. Desenvolvimento do sistema sensorial do jundiá *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE). Dissertação de Mestrado, Curitiba, 2011.
- ASSIS, J.M.F. CARVALHO, R.F. BARBOSA, L. AGOSTINHO, C.A. DAL PAI-SILVA, M. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*, v. 237, p.251-67, 2004.
- BALDISSEROTTO, B. RADÜNZ NETO, J. *Criação de jundiá*. Santa Maria: UFSM, 2004.
- BARCELLOS, L.J.G. WASSERMANN, G.F. SCOTT, A.P. WOEHLE, V.M. LUTHIER, F. QUEVEDO, R. M. ITTZÉS, I. KRIEGER, M. H. Plasma steroids concentrations in relation reproductive cycle cultured male *Rhamdia quelen*. *Journal of Fish Biology*, v. 61, n.3, p.751-763, 2002.
- BARILLET, S.A. LARNOA, V. FLORIANI, M.A. DEVAUXB, A. ADAM-GUILLERMINA, C. Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. *Aquatic Toxicology*, v.100, p.295–302, 2010.
- BARRESI, M.J.F. D'ANGELO, J.A. HERNANDEZ, P.L. STEPHEN, H. DEVOTO. Distinct mechanisms regulate slow-muscle development. *Current Biology*, v.11, p.1432–1438, 2001.
- BARTON-DAVIES, E.R. SHOTURMA, D.I. SWEENEY, H.L. Contribution of satellite cells to IGF-1 induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiology Scand.*, v.167, p. 301-305, 1999.
- BASERGA, R. Growth regulation of the PCNA gene. *Journal of Cell Science*, v.98, p.433–436, 1991.

BIGA, F.W. GOETZ, P.R. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 291, n.5, p.1327-37, 2006.

BLACKWELL, T.K. WEINTRAUB, H. Differences and similarities in DNA-Binding MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science*, v.250, p.1104-1110, 1990.

BLAGDEN, C.S. CURRIE, P.D. INGHAM, P.W. HUGHES, S.M. Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes Development*, v.11, p.2163-75, 1997.

BONE, Q. On the function of the two types of myotomal muscle fibre in elasmobranch fish. *Journal of Marine Biology Association U.K.*, v.46, p. 321-349, 1966.

BRAVO, R. GRANK, R. BLUNDELL, P.A. MACDONALD-BRAVO, H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature*, v.326, p.515–517, 1987.

BUCKINGHAN, M. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Current Opinion Gene Development*, v.11, p.44-448, 2001.

CARNEIRO, P.C.F. MIKOS, J.D. BENDHACK, F. Processamento: O jundiá como matéria prima. *Panorama da Aqüicultura*, v.13, p.17-21, 2003.

CASTILLO, J. CODINA, M. MARTÍNEZ, M. L. NAVARRO, I. GUTIÉRREZ, J. Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells in rainbow trout. *American Journal Physiology*, v.286, p.935-941, 2004.

CASTILLO, J. CODINA, M. MARTÍNEZ, M. L. NAVARRO, I. WEIL, C. FAUCONNEAU, B. GUTIÉRREZ, J. IGF-I binding in primary culture of muscle cells of rainbow trout: changes during *in vitro* development. *American Journal Physiology*, v.283, p.647-652, 2002.

CHIPPARI-GOMES, A.R. GOMES, L.C. BALDISSEROTTO, B. Lethal temperatures for Silver Catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *Journal Appliance Aquaculture*, v.9, p.11–21, 1999.

COLE, N.J. HALL, T.E. MARTIN, C.I. CHAPMAN, M.A. KOBAYAMA, A. NIHEI, Y. WATABE, S. JOHNSTON, I.A. Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio*. *L. J. Exp. Biol.*, v.207, p.4239-4248, 2004.

CONLON, R.A. REAUME, A.G. ROSSANT, J. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development*, v. 121, p.1533-1545, 1995.

CURRIE, P.D. INGHAM, P.W. Induction and patterning of embryonic skeletal muscle cells in the zebrafish. In: Johnston I.A., *Muscle Development Growth*, p. 1-17, 2001.

CUSELLA-DE ANGELIS, M.G. LYONS, G. SONNFNO, C. ANGELIS, L. VFVARELLI, E. FARMER, K. WRIGHT, W. MOLFNARO, E.M. BOUCHÉ, M. BUCKFNNGHAM, M. COSSU, G. MyoD, myogenin independent differentiation of primordial myoblasts in mouse somites. *The Journal of Cell Biology*, v. 116, 1992.

DAL PAI, V. DAL PAI-SILVA, M. CARVALHO, E. D. FUJIHARA, C. Y. GREGORIO, E. A. CURI, P. R. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal tissue of the pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). *Anatomy_Histology Embryology*, v.29, p.283-289, 2002.

DAL PAI-SILVA, M. CARVALHO, R.F. PELLIZZON, C.H. DAL PAI, V. Muscle fiber types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue Cell*, v.35, n.3, p.179-187, 2003a.

DAL PAI-SILVA, M. DAL PAI, V. MOTA, D.I. RODRIGUES, A.C. Histochemical study of muscle fiber types in *Symbrachus marmoratus* (BOCH,1795). *Annual Anatomy*, v. 177, p.65-70, 2005.

DAL PAI-SILVA, M. FREITAS, E.M.S. DAL PAI, V. RODRIGUES, A.C. Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. *Archive of Fish Marine Research*, v. 50, n. 2, p. 149-160, 2003b.

DAUGHADAY, W.H. ROTWEIN, P. Insulin-like growth factors 1 and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrine Revision*, v.10, p.68-69, 1989.

DELLIAS, J.M.M. ONOFRE, G.R. WERNECK, C.C. LANDEIRA-FERNANDEZ, A.M. MELO, F.R. FARIAS, W.R.L. SILVA, L.C.F. Structural composition and differential anticoagulant activities of dermatan sulfates from the skin of four species of rays, *Dasyatis americana*, *Dasyatis guttata*, *Aetobatus narinari* and *Potamotrygon motoro*. *Biochimie*, v. 86, n. 9-10, p. 677-683, 2004.

DEVOTO, S.H. MELANCON, E. EISEN, J.S. WESTERFIELD, M. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development*, v.122, p.3371-80, 1996.

DIETRICH, C.P. DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Analytical Biochemistry*, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DRIEDZIC, W.R. HOCHACHKA, P.W. Control of energy metabolism in fish white muscle. *American Journal of Phisiology*, v. 230, p. 579-582, 1976.

DUBAND, J.L. THIERY, J.P. Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. *Developmental Biology*, v.94, p.337-350, 1982.

EDMONDSON, D.G. OLSON, E.N. Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *Journal of Biological Chemistry*, v.268, p.755-755, 1993.

EL-SAYED, A.F.M. Tilapia Culture. CABI Publishing, Oxfordshire, UK, p. 2-293. 2006.

ENGEL, A. FRANZINI-ARMSTRONG, C. *Myology :basic and clinical*, McGraw-Hill, v.1, p.

3-118, 1994.

ERBY, E. PARK, I.H. NUZZI, P.D. SCHOENHERR, C.J. CHEN, J. IGF-II transcription in skeletal myogenesis is controlled by mTOR and nutrients. *Journal of Cell Biology*, v.163, p.931-936, 2003.

ERNST, S. LANGER, R. COONEY, C.L. SASISEKHARAN, R. Enzymatic degradation of glycosaminoglycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. v. 30, p. 387-444, 1995.

FERREIRA, A.A. NUNER, A.P.O. ESQUIVEL, J.R. Influência da temperatura sobre os ovos e as larvas de jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae). Florianópolis, *Anais do Simpósio Brasileiro de Aqüicultura*, Sociedade Brasileira de Aqüicultura, 2000.

FINN, R.N. The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria. *Aquatic Toxicology*, v.81, p.337-354, 2007.

FORGATI, M. Crescimento e tempo de desenvolvimento embrionário do jundiá (*Rhamdia quelen*) incubados em diferentes temperaturas. (conclusão de curso de graduação em Ciências Biológicas, Curitiba, 2008.

FORGATI, M. MAIOLINO, C.V. AZEVEDO, K.L. RODRIGUES-GALDINO, A.M. SILVA, A.F. MIKOS, J.D. CARNEIRO, P.C.F. DONATTI, L. RIOS, F.S. Incubation temperature affecting growth of jundiá (*Rhamdia quelen*) (Teleostei, Heptapteridae) during embryonic and larval periods. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu - MG. Anais, 2007b.

FORGATI, M. MAIOLINO, C.V. RODRIGUES-GALDINO, A.M. SCHITTINI, A.V. DONATTI, L. CARNEIRO, P. C. F. RIOS, F. S. Efeito da temperatura na utilização de vitelo e no período de eclosão do jundiá (*Rhamdia quelen*, Heptapteridae). In: XVII Encontro Brasileiro de Ictiologia, Itajaí. Anais, p.131-132, 2007a.

FRANCO, C.R.C. TRINDADE, E.S. ROCHA, H.A. VEIGA, S.S. PALUDO, C.S. NADER, H.B. DIETRICH, C.P. Glycosaminoglycan chains alfa5 beta1 integrin are involved in fibronectin-dependent cell migration. *Biochemistry and Cell Biology* (Online), v.87, p. 677-686, 2009.

FUTCHER, A.B. LEVY, M.Z. ALLSOPP, R.C. GREIDER, C.W. HARLEY, C.B. Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of Molecular Biology*, v. 225, n. 4, p. 951-60, 1992.

GABILLARD, J.C. WEIL, C. RESCAN, P.Y. NAVARRO, I. GUTIÉRREZ, J. Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2, and IGF type I receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene Comportamental Endocrinology*, v.133, p.233-242, 2003.

GALLOWAY, T.F. KJORSVIK, E. KRYVI, H. Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) related to different somatic growth rates. *Journal of Experimental Biology*, v. 202, p. 2111– 2120, 1999a.

- GALLOWAY, T.F. KJORSVIK, E. KRYVI, H. Muscle growth in yolk-sac larvae of the Atlantic halibut as influenced by temperature in the egg and yolk-sac stage. *Journal of fish Biology*, v.55, p. 26– 43, 1999b.
- GILBERT, S.F. *Biologia do Desenvolvimento*. FUNPEC, 5º Edição. Ribeirão Preto, São Paulo, p.343-349, 2003.
- GOLDSPINK, G. Malleability of the motor system: a comparative approach. *J.Exp. Biol.*, v.11, p. 375-391, 1985.
- GOMES, L.C. GOLOMBIESKI, J.I. CHIPPARI GOMES, A.R. BALDISSEROTTO, B. *Biologia do jundiá Rhamdia quelen* (PISCES, PIMELODIDAE): uma revisão. *Ciência Rural*, v.30, n.1, p.179-185, 2000.
- GREER-WALKER, M. PULL, G.A. A survey of red and white muscle in marine fish. *Journal of fish Biology*, v.7, p.295– 300, 1970.
- HALL, T.E. COLE, N.J. JOHNSTON, I.A. Temperature and the expression of seven muscle-specific protein genes during embryogenesis in the Atlantic cod (*Gadus morhua*) *Journal of Experimental Biology*, v.206, p.3187-3200, 2003.
- HANDEL, T.M. JOHNSON, Z. CROWN, S.E. LAU, E.K. SWEENEY, M. PROUDFOOT, A.E. Regulation of protein function by glycosaminoglycans - as exemplified by chemokines. *Annual Revision in Biochemistry*, v. 74, p. 385-410, 2005.
- HATTA, K. BREMILLER, R. WESTERFIELD, M. KIMMEL, C.B. Diversity of expression of engrailed-like antigens in zebrafish. *Development*, v. 112, p.821–832, 1991.
- HAY, E.D. *Cell Biology of extracellular matrix*. 2º Edição, Plenum Press, New York, 463p, 1991.
- HAY, E.D. Cell-matrix interactions in the embryo: Cell shape, cell surface, cell skeletons, and their role in differentiation. In "The Role of Extracellular Matrix in Development," Trelstad, R.L. New York, p. 1-31, 1984.
- HEASMAN, J. HYNES, R. D. SWAN, A. P. THOMAS, V. WYLE, C. C. Primordial germ cells of *Xenopus* embryos: The role of fibronectin in their adhesion during migration. *Cell*, v.27, p.437-447, 1981.
- HOLTERMAN, C.E. RUDNICKI, M.A. Molecular regulation of satellite cell function. *Seminars in Cell e Developmental Biology*, v. 16, p.575-584, 2005.
- HOULIHAN, D.F. Protein turnover in ectotherms and its relationship to energetics. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, v.7, R. Gilles, Springer-Verlag, Berlin, p. 1-43, 1991.
- HOULIHAN, D.F. MATHERS, E. FOSTER, A.R. Biochemical correlates of growth rate in fish. In: Jensen, J.C., Rankin, F.B. *Fish Ecophysiology*. Chapman e Hall, London, p. 45–71, 1993.
- <http://www.santaregina.com.br/index.php?acao=17ecodigo=48> (Acessado em 23.jan.2013).

HUXLEY, H.E. Molecular basis of contraction in cross-striated muscles and relevance to motile mechanisms in other cells. In: Stracher A, *Muscle and Non muscle Motility*, Academic Press, London, 1983.

HUXLEY, H.E. The structural basis of muscular contraction. *Proc Research Society London B Biology Science*, v. 178, p. 131-149, 1971.

HUXLEY, H.E. The mechanism of muscular contraction. *Science*, v. 164, p. 1356-1365, 1969.

JAKES, L.B. BALUEUX, R.E. DIETRICH, C.P. KAVANAGH, L.W. A microelectrophoresis method for heparin. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v.46, n.3, p.351-360, 1968.

JOHANSEN, K.A. OVERTURF, K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Biotechnology*, v.7, p.576-587, 2005.

JOHNSTON, I.A. Genetic and environmental determinants of muscle growth patterns. In: JOHNSTON, I.A (Ed), *Muscle Development and Growth. Fish Physiology*, v. 18, p. 141-186, 2001.

JOHNSTON, I.A. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture*, v. 177, p.99-115, 1999.

JOHNSTON, I.A. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. *Cell Tissue Research*, New York, v. 214, p. 369-379, 1981.

JOHNSTON, I.A. Specialization of fish muscle. In: GOLDSPIK, D.F. (Ed.). *Development and specializations of muscle*. On line version, p. 123-148, 1980.

JOHNSTON, I.A. COLE, N.J. ABERCROMBY, M. VIEIRA, V.L.A. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring (*Clupea harengus*). *Journal of Experimental Biology*, v. 201, p. 623-646, 1998.

JOHNSTON, I.A., COLE, N.J., VIEIRA, V., DAVIDSON, I. Temperature and developmental plasticity of muscle phenotype in herring larvae. *The Journal of experimental biology*, v.200, p.849-68, 1997.

JOHNSTON, I.A. BOWER, N. I. E MACQUEEN, D. J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *The Journal of experimental biology*, v. 214, n. 10, p.1617-28, 2011.

JOHNSTON, I.A. HALL, T.E. Mechanisms of muscle development and responses to temperature change in fish larvae. *American Fish Society Symposium*, v. 40, p. 85-116, 2004.

JOHNSTON, I.A. LEE, H.T. MACQUEEN, D.J. Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes. *The Journal of experimental biology*, v.212, p.1781- 93, 2009.

JOHNSTON, I.A. MANTHRI, S. ALDERSON, R. SMART, A. CAMPBELL, P. NICKELL, D. ROBERTSON, B. PAXTON, C.G.M. BURT, M. L. Fresh water environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in sea water stages of Atlantic salmon (*Salmo* *Experimental Biology*, v.206, p.1337-1351, 2003.

JOHNSTON, I. A. MOON, T. W. Exercise training in skeletal muscle of the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of Experimental Biololgy*, v.87, p.177-194, 1980.

JOHNSTON, I.A., MCLAY, H.A., ABERCROMBY, M. ROBBINS, D. Phenotypic plasticity of early myogenesis and satellite cell numbers in Atlantic salmon spawning in upland and lowland tributaries of a river system. *Journal of Experimental Biology*, v.203, p.2539– 2552, 2000.

JOHNSTON, I.A, VIEIRA, V.L.A. ABERCROMBY, M .Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring, *Clupea harengus*. *Journal of Experimental Biology*, v. 198, p. 1389-1403, 1995.
salar) of

JUNQUEIRA, L.C. CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11° Ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 524p, 2008.

KIERSZENBAUM, A.L. *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia*. Elsvier, Rio de Janeiro, 199-210, 2008.

KIMMEL, C.B. WARGA, R.M. SCHILING, T.F. Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development*, v.108, p.581-584, 1990.

KLIMOGIANNI, A. KOUMOUNDOUROS, G. KASPIRIS, Æ. P. KENTOURI, M. Effect of temperature on the egg and yolk-sac larval development of common Pandora, *Pagellus erythrinus*. *Marine Biology*, v.145, p.1015-1022, 2004.

KNIGHT, R. MEBUS, K. D'ANGELO, A. YOKOYA, K. HEANUE, T. CONSORTIUM, T. S. ROEHL, H. Ret signalling integrates a cranio facial muscle module during. *Development*, v.138, p.2015-2024, 2011.

KOBIYAMA, A. NIHEI, Y. HIRAYAMA, Y. KIKUCHI, K. SUETAKE, H. JOHNSTON, I. A. WATABE, S. Molecular cloning and developmental expression patterns of the MyoD and MEF2 families of muscle transcription factors in the carp. *Journal of experimental biology*, v.201, p.2801, 1998.

KOUMANS, J.T.M. e AKSTER, H.A. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comparative Biochemistry Physiology*, v.110, p.3-20, 1995.

LASH, J.W. e YAMADA, K.M. The adhesion recognition signal of fibronectin: A possible trigger mechanism for compaction during somitogenesis. In R. Bellairs, D. H. Ede and J. W. Lash (eds.), *Somites in Developing Embryos*. Plenum, New York, p. 201-208, 1986.

LASSAR, A. BUSKIN, J.N. LOCKSHON, D. DAVIS, R.L. APONE, S. HAUSCHKA, S.D. WEINTRAUB, H. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell*, v.58, p.823-831,

1989.

LIFE SCIENCES (2010), Disponível em: <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/LifeScience/GeneralBiology/PhysiologyTheBones/MuscularSkeletal/MuscularSkeletal.htm>. Acesso em: 10 julho 2010.

LUCHINI, L. AVENDAÑO, T. Primeros resultados de cultivo de un pez de augas calidas (*Rhamdia sapo*) con fines de produccion y consumo humano. *Revista Argentina de Produccion Animal*, v.4, p.621-629, 1985.

MACQUEEN, D.J. e JOHNSTON, I.A. A novel salmonid myoD gene is distinctly regulated during development and probably arose by duplication after the genome tetraploidization. *FEBS Lett.*, v.580, p.4996-5002, 2006.

MACQUEEN, D.J. ROBB, D. JOHNSTON, I.A. Temperature influences the coordinated expression of myogenic regulatory factors during embryonic myogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Journal of Experimental Biology*, v.210, p.2781-2794, 2007.

MAIOLINO, C.V. Ontogênese do sínclrio de *Rhamdia quelen* (Teleostei: Siluriformes). Dissertação de mestrado, Curitiba, 2012.

MAIOLINO, C.V. FORGATI, M. SCHITTINI, A.V. RODRIGUES-GALDINO, A.M. MIKOS, J.D. CARNEIRO, P.C.F. DONATTI, L. RIOS, F.S.A. Organogênese do jundiá (*Rhamdia quelen*). 16º Evento de Iniciação Científica da UFPR, EVINCI, Anais, 2008b.

MAIOLINO, C.V. FORGATI, M. WOSNICK, N. RODRIGUES-GALDINO, A.M. MIKOS, J.D. CARNEIRO, P.C.F. DONATTI, L. RIOS, F.S.A. Miogênese do Jundiá (*Rhamdia quelen*) em diferentes temperaturas de incubação. In: XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia. Anais do XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia. CD, 2008a.

MALEK, R.L. SAJADI, H. ABRAHAM, J. GRUNDY, M.A. GERHARD, G.S. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and pharmacology: CBP*, v.138, p.363-73, 2004.

MANSOUR, M. B. MAJDOUB, H. BATAILLE, I. ROUDESLI, M. S. HASSINE, M. AJZENBERG, N. CHAUBET, F. MAAROUFI, R. M. Polysaccharides from the skin of the ray *Raja radula*. Partial characterization and anticoagulant activity. *Thrombosis Research*, v. 123, n. 4, p. 671-678, 2009.

MARCHIORO, M.I. BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* QUOY e GAIMARD, 1824) à variação de salinidade na água. *Ciência Rural (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science)*, v.29, p.315-318, 1999.

MARECO, E.A. Efeitos da temperatura na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem GIFT. Botucatu, Dissertação de Mestrado, 2012.

MARTINEZ, I.I. CANO, F.G. ZARZOSA, G.R. VAZQUEZ, J.M. LATORRE, R. ALBORS, O.L. ARENCIBIA, A. ORENES, Y.M. Histochemical and morphometric aspects of the lateral musculature of different species of teleost marine fish of the Percomorphi order. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine*, v. 29, p. 211-219, 2000.

MATSAKAS, A. PATEL, K. Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. *Histology and histopathology*, v.24, n.2, p.209-22, 2009.

MAURO, A. ADAMS, W.R. The structure of the sarcolemma of the frog skeletal muscle fiber. *Journal of Biophysical Biochemistry Cytology*, v.10, n.4, p.177-185, 1961.

MCCROSERY, S. THOMAS, M. MAXWELL, L. SHARMA, M. KAMBADUR, R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and selfrenewal. *Journal of Cell Biology*, v.162, p.1135-1147, 2003.

MCPHERRON, A.C. LAWLER, A.M. LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, v.387, p.84-90, 1997.

MEDEIROS, G.F. MENDES, A. CASTRO, R.A.B. BAÚ, E.C. NADER, H.B. DIETRICH, C.P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochemical et Biophysica Acta*, v. 1475, n. 3, p. 285-294, 2000.

MOKSNESS, E. ROSENLUND, G. LIE, O. Effect of fish meal quality on growth of juvenile wolfish, *Anahichas lupus L.* *Aquaculture Research*, v.26, p.109– 115, 1995.

MOLKENTIN, J.D. OLSON, E.N. Defining the regulatory networks for muscle development. *Current Opinion Genetic Development*, v.6, p.445– 453, 1996.

MORIYAMA, S. AYSON, F. G. KAWAUCHI, H. Growth regulation by insulin-like growth factor I in fish. *Biotechnology Biochemistry*, v.64, p.1553-1562, 2000.

MURRE, C. MCCAWE, P.S. VAESSIN, H. CAUDY, M. JAN, L.Y. JAN, Y.N., CABRERA, C.V. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, v.58, p.537-44, 1989.

NANDINI, C. D. ITOH, N. SUGAHARA, K. Novel 70-kDa chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains with a unique heterogeneous sulfation pattern from shark skin, which exhibit neuritogenic activity and binding activities for growth factors and neurotrophic factors. *Journal of Biology Chemistry*, v. 280, n. 6, p. 4058-4069, 2005.

NATHANAILIDES, C. LOPES-ALBROS, O. ABELLAN, E. VAZQUER, J.M. TYLER, D.D. ROWLERSON, A. STICKLAND, N.C. Muscle cellularity in relation to somatic growth in the European sea bass *Dicentrarchus labrax (L)*. *Aquaculture Research*, v.27, p.885–889, 1996.

NELSON, D.L. COX, M.M. *Lehninger – Principles of Biochemistry*. 4° Ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2005.

OHANNA, M. SOBERING, A.K. LAPOINTE, T. LORENZO, L. PRAUD, C. PETROULAKIS, E. SONENBERG, N. KELLY, P.A. SOTIROPOULOS, A. PENDE, M. Atrophy of S6K1^{-/-} skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nature Cell Biology*, v.7, p.286-294, 2005.

ONOFRE-OLIVEIRA, P.C.G. Avaliação do Padrão de degeneração e regeneração muscular em diferentes modelos murinos para distrofias musculares progressivas. São Paulo, dissertação de mestrado, 71p, 2009.

ORDAHL, C.P. Myogenic lineages within the developing somite. In M. Bernfield (ed.), *Molecular Basis of Morphogenesis*. Wiley-Liss, New York, p. 165-170, 1993.

PACKARD, D.S. JR. MEIER, S. An experimental study of somitomeric organization of the avian vegetal plate. *Developmental Biology*, v. 97, p.191-202, 1983.

PARKER, M.H. SEALE, P. RUDNICKI, M.A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature Reviews Genetics*, v.4, n.7, p.497-507, 2003.

PATRUNO, M. MACCATROZZO, L. FUNKENSTEIN, B. RADAELLI, G. Cloning and expression of insulin-like growth factors I and II in the shi drum (*Umbrina cirrosa*). Comparative biochemistry and physiology. Part B, *Biochemistry e molecular biology*, v.144, n.2, p.137-51, 2006.

PELEGRI, F. The Role of Maternal Factors in Early Zebrafish Development. (C. Leong e K. Vanya, Eds.) in *Fish Development and Genetics the Zebrafish and Medaka Models*, World Scientific Publishing, 2° ed., p. 1-38, 2004.

PETERSON, R.H. MARTIN-ROBICHAUND, D.J. e HARMON, P. Influence of incubation temperature on body movements of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) embryos and on size at hatch. *Aquaculture Research*, v.35, p.453-457, 2004.

REHFELDT, C. FIELDLER, I. DETL, G. ENDER, K. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Livestock Production Science*, v.66, p.177-188, 2000.

RESCAN, P.Y. Identification of a fibroblast growth factor 6 (FGF6) gene in a non-mammalian vertebrate: continuous expression of FGF6 accompanies muscle fiber hyperplasia. *Biochemistry. Biophysical Acta*, v.1443, p.305–314, 1998.

RESCAN, P.Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, p.130, 2001.

RODRIGUES, J. A. G VANDERLEI, E. S. O. QUEIROZ, I. N. L. QUINDERÉ, A. L. G. BENEVIDES, N. M. B. Purificação e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados da pele da carpa comum, *Cyprinus carpio*. *Revista Ciência Agronômica*, v. 40, n. 3, p. 381-387, 2009b.

RODRIGUES, J. A. G. VANDERLEI, E. S. O. QUEIROZ, I. N. L. QUINDERÉ, A. L. G. FONTES, B.P. QUEIROZ, I.N.L. BENEVIDES, N. M. B. Glicosaminoglicanos isolados da pele de palombeta (*Chloroscombrus chrysurus*) e guaiúba (*Ocyurus chrysurus*): características e implicações biológicas. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 34, n. 2,

p. 141-148,2012.

RODRIGUES, J. A. G. QUINDERÉ, A. L. G. QUEIROZ, I. N. L. COURA, C. O. ARAÚJO, G. S. BENEVIDES, N. M. B. Purificação, caracterização físicoquímica e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados da pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum Technology*, v. 33, n. 3, p. 233-241, 2011.

RODRIGUES-GALDINO, A.M. Descrição do desenvolvimento embrionário e larval do jundiá (*Rhamdia quelen*). 2005. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Paraná, 2006.

RODRIGUES-GALDINO, A.M. Estadiamento dos embriões e larvas e avaliação da qualidade das larvas e pós-larvas do peixe neotropical jundiá *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) produzidas sob diferentes temperaturas de incubação Curitiba. Dissertação de Mestrado, 2009.

RODRIGUES-GALDINO, A.M. FORGATI, M. MAIOLINO, C.V. AZEVEDO, K.L. SILVA, A.F. MIKOS, J.D. DONATTI, L. CARNEIRO, P.C.F. RIOS, F.S. Morphogenetic movements during gastrulation of *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae): effects of temperature incubation. In: XXI Congresso Brasileiro de Microscopia e Microanálise, Aramação dos Búzios - RJ. Anais, 2007b.

RODRIGUES-GALDINO, A.M. MAIOLINO, C.V. FORGATI, M. MIKOS, J.D. DONATTI, L. CARNEIRO, P.C.F. RIOS, F.S. Stages of embryonic and larval development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. *Zygote*, v.18, p. 131–144, 2010.

ROWLERSON, A. VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Johnston I.A. *Muscle Development and Growth*. Academic Press, *Fish Physiology*, v.18, p.103–140, 2001.

SAKA, S. FIRAT, K. COBAN, D. Development of the common dentex (*Dentex dentex*) eggs in relation to temperature. *Aquaculture Research*, v.35, p.224-231, 2004.

SÄNGER, A.M. CLAASSEN, H. ADAM, H. The arrangement of muscle fiber types in the axial muscle of various cyprinids (Teleostei). *Zoologischer Anzeiger*, v. 221, p. 44-49, 1990.

SÄNGER, A.M. Quantitative fine structural diversification of red and white muscle fibres in cyprinids. *Environmental Biology of Fishes*, v. 33, p.97-104, 1992.

SÄNGER, A.M. STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: JOHNSTON, I.A. (Ed.). *Muscle developmental growth*, v. 18, p.187-250, 2001.

SANTOS, V.B. Aspectos morfológicos da musculatura lateral dos peixes. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.1, p. 127-135, 2007.

SCHIAFFINO, S. MARGARETH, A. Coordinated development of the sarcoplasmic reticulum and T-system during postnatal differentiation of rat skeletal muscle. *Journal Of Cellular Biology*, v.4, p.855-874, 1969.

SILFVERGRIP, A.M.C. A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia*. Department of Zoology, Stockholm and Department of Vertebrate Zoology. Swedish Museum of the Natural History. Stockholm, 1996.

SNOW, S. Satellite cell activity during hypertrophy of the rat soleus muscle following surgical ablation of the soleus synergists. *Anatomy Research*, v. 214, p. 125, 1986.

SOUZA, C. Efeito do cálcio na sobrevivência, crescimento e miogênese do *Rhamdia quelen* durante o desenvolvimento larval e pós-larval. Curitiba. Dissertação de Mestrado. 2012.

SOUZA, M. L. S. DELLIAS, J. M. M. MELO, F. R. SILVA, L. C. F. Structural composition and anticoagulant activity of dermatan sulfate from the skin of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 147, n. 3, p. 387-394, 2007a.

SOUZA, M. L. S. FREITAS, C. F. DOMINGOS, M. A. O. NUNES-TAVARES, N. HASSON-VOLOCH, A. NASCIUTTI, L. E. SILVA, L. C. F. Identification and distribution of condroitin sulfate in the three electric organs of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 146, n. 2, p. 227-233, 2007b.

STICKLAND, N.C. Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Anatomy*, v.137, p.323– 333, 1983.

STICKLAND, N.C. WHITE, R.N. MESCALL, P.E. CROOK, A.R. THORPE, J.E. The effect of temperature on myogenesis in embryonic development of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Anatomical Embryology*, v.178, p.253– 258, 1998.

STITT, T.N. DRUJAN, D. CLARKE, B.A. PANARO, F. TIMOFEYVA, Y. KLINE, W.O. GONZALEZ, M. YANCOPOULOS, G.D. GLASS, D.J. The IGF- 1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular Cell*, v.14, p.395- 403, 2004.

STOIBER, W. SANGER, A.M. An electron microscopic investigation into the possible source of new muscle fibre in teleost fish. *Anatomical Embryology*, v.194, p.569– 579, 1996.

THOMAS, M. LANGLEY, B. BERRY, C. SHARMA, M. KIRK, S. BASS, J. KAMBADUR, R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *Journal of Biology Chemistry*, v. 275, 2000.

TURNBULL, J. POWELLA, A. GUIMONDA, S. Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Cell Press*, v.11, n. 2, p.75–82, 2001.

USGS (2006) U.S. Geological Survey. Disponível em: <http://www.nas.er.usgs.gov/.../FactSheet.asp?speciesID=839>. Acesso em: 22 nov.2006.

VALENTE, L.M.P. ROCHA, E. GOMES, E.F.S. SILVA, M.W. OLIVEIRA, M.H. MONTEIRO, R.A.F. FAUCONNEAU, B. Growth dynamics of white and red muscles in fast and slow growing strains of rainbow trout. *Journal of fish Biology*, v.55, p.675– 691, 1999.

VEGGETTI, A. MASCARELLO, F. SCAPOLO, P.A. ROWLERSON, A. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural and morphometric study. *Anatomical Embriology*, v. 182, p. 1-10, 1990.

VIANELLO, S. BRAZZODURO, L. DALLA VALLE, L. BELVEDERE, P. COLOMBO, L. Myostatin expression during development and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Endocrinology*, v.176, p.47–59, 2003.

VIDELER, J.J. An opinion paper: emphasis on white muscle development and growth to improve farmed fish flesh quality. *Fish physiology and biochemistry*, v.37, n.2, p.337-43, 2011.

VIEIRA, V.L.A. JOHNSTON, I.A. Muscle development in the tambaqui, an important Amazonian food fish. *Journal of fish Biology*, v.49, p.842–852, 1992.

WATABE, S. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *Journal of Fish Biology*, v.55, p.1-18, 1999

WATABE, S. Myogenic regulatory factors. In: Johnston, I. A. Fish physiology - Muscle Development and Growth. *Academic Press*, v.156, p.19-39, 2001.

WEATHERLEY, A.H. GILL, H.S. LOBO, A.F. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibers in the teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *Journal of fish Biology*, v. 33, p. 851-859, 1988.

WEINTRAUB, H. DAVIS, R. TAPSCOTT, S. THAYER, M. KRAUSE, M. BENEZRA, R., BLACKWELL, T. K. TURNER, D. RUPP, R. HOLLENBERG, S. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*, v.251, p.761-766, 1991.

WEINTRAUB, H. The MyoD family and myogenesis: Redundancy, networks, and thresholds. *Cell*, n.75, p.1241-1244, 1993.

WOLPERT, L. BEDDINGTON, R. BROCKES, J. JESSEL, T. LAWRENCE, P. MEYEROWITZ, E. *Principios da Biologia do Desenvolvimento*. Porto Alegre: Artmed, 484 p, 2000.

WU, M. XU, S. ZHAO, J. KANG, H. DING, H. Physicochemical characteristics and anticoagulant activities of low molecular weight fractions by free-radical depolymerization of a fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber *Thelenata ananas*. *Food Chemistry*, v. 122, n. 3, p. 716-723, 2010.

XU, C. WU, G. ZOHAR, Y. DU, S.J. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *Journal of Experimental Biology*, v.206, p.4067- 4079, 2003.

YAMADA, K.M. Adhesive recognition sequences. *Journal of Biological Chemistry*, v.266, p.12809–12812, 1991.

Anexos

ANEXO I – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 316

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.019887/2008-05

APROVADO:

17/06/2008 – R.O. 05/2008

TÍTULO: Desenvolvimento embrionário e pós-embrionário de peixes: descrição morfológica e estudo dos efeitos das condições ambientais no desenvolvimento de peixes

AUTORES: Flavia Sant'Anna Rios, Lucélia Donatti, Alana Marielle R. Galdino, Paulo César F. Carneiro, Peter Kirschnik, Lúcia Elvira Álvares, Mariana Forcati, Camila Valente Maiolino

DEPARTAMENTO:

Biologia Celular

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
Coordenadora do CEEA

ANEXO II – PROTOCOLOS UTILIZADOS

Protocolo Microscopia de Luz - Histoiresina Leica®Infiltração:

- 1) Lavagem em:
 - Álcool 70% - 10min
 - Álcool 80% - 10min
 - Álcool 90% - 10min
 - Álcool 95% - 10min
 - Álcool 100% - 10min
 - Álcool 100% - 10min
- 2) Lavagem em Solução A + Álcool 100% (1:1) – 4h ou mais (pode ficar até mais que 2 semanas)
- 3) Lavagem em solução A - 1 semana com uma troca no meio da semana

Emblocagem:

- 1) colocar no Becker: 1200uL solução A + 52uL solução B;
- 2) misturar bem com o palito de dente (cuidado p não fazer bolhas);
- 3) fazer sobre almofada de gelo;
- 4) pipetar 600uL da resina em cada pocinho do molde e posicionar a amostra;
- 5) levar ao dessecador, fazer vácuo e deixar overnight;

Corte:

- 1) Em micrótomo usando navalha de tungstênio;
- 2) Corte de 5µm.

Coloração:

- 1) Colocar na água por 5min
 - 2) Corar com Hematoxilina - 3 min
 - 3) Lavar com água corrente* - 10 min
 - 4) Corar com Eosina - 1 min
 - 5) Lavar com água
 - 6) Deixar secar sobre a placa aquecedora.
 - 7) Depois de corar e deixar secar (na placa aquecida) montar entre lâmina e lamínula, usando o permount como selante.
- colocar a cubeta com as lâminas dentro da pia com a torneira aberta e deixar escorrer água dentro da cubeta. A cubeta vai tranbordar. Não deixe sair muita água (fraqinho) e não deixe a água escorrer direto em cima dos cortes.

Protocolo Microscopia Eletrônica de Transmissão

| PROCEDIMENTO | | TEMPO | QUANTIDADE |
|--|---------------------------------------|-----------|------------|
| Material está em Karnovski; LAVAR 3X COM Tampão Cacodilato 0,2M. | | | |
| Colocar em Tetróxido de Ósmio a 2% em Tampão Cacodilato 0,2M (pH 7,2) em temperatura ambiente; | | 1h | 1x |
| Lavar com água destilada; | | | 2x |
| Colocar em Uranila aquosa a 2% (cobrir com papel alumínio); | | 2h | 1x |
| Lavar com água destilada até a solução do tubo ficar clara; | | | 2x |
| Desidratar em: | Álcool 50% | 5min | 2x |
| | Álcool 70% | 5min | 2x |
| | Álcool 95% | 10min | 2x |
| | Álcool 100% (PA) | 10min | 3x |
| | Álcool 100% + Acetona (1:1) – | 10min | 1x |
| | Acetona 100% (PA) | 15min | 2x |
| Pré-Infiltração: | Acetona + Resina (1:1) –(tubo aberto) | 1h30min | 1x |
| | Resina pura (tubo aberto) | overnight | 1x |
| Inclusão: | Manter na estufa a 60°C | 72h | 1x |
| Trimar | | | |
| Cortes Semi-finos no ultramicrotomo usando navalha de diamante | | | |
| Cortes Ultrafinos e telinhas para o Microscópio. | | | |

Protocolo Imunohistoquímica

1. Pegar o material em PFA e lavar em PBS 0.1M
2. **Permeabilização:** colocar as amostras em detergente (PBS em TritonX-100 0,5%) para abrir a malha – sob agitação (noite 4°C)
3. Lavar em PBS 0,1M – 3x (manter em PBS)
4. **Bloqueio da fluorescência do PFA** – 10min
Glicina → diluir PBS 0,1M + Triton diluído 0,5%
5. Lavar em PBS 0,1M – 3x (para retirar a glicina)
6. **Bloqueio das ligações inespecíficas** – 1h
BSA 1% + PBS 0,1M + Triton 0,5% + anticorpo
 - Colocar o anticorpo primário direto sem lavagem.
7. **Incubação do anticorpo primário** – O/N
BSA 1% + PBS 0,1M + Triton 0,5%
8. Lavar em PBS 0,1M + Triton 0,5% - 1x (retirar o excesso de anticorpo)
9. Lavar em PBS 0,1M – 4x
10. **Bloqueio das ligações inespecíficas para o anticorpo secundário** – 1h
BSA 1% + PBS 0,1M + Triton 0,5%
 - Colocar o anticorpo direto sem lavagem.
11. **Incubação do segundo anticorpo primário** (em caso de marcação dupla ou tripla) – 4h.
 - Diluir em BSA 1% + PBS 0,1M + Triton 0,5%);
12. Lavar em PBS 0,1M + Triton 0,5% - 1x (retirar o excesso de anticorpo)
13. Lavar em PBS 0,1M – 4x

ABAIXO TUDO NO ESCURO

14. **Bloqueio das ligações inespecíficas para o anticorpo secundário** – 1h
BSA 1% + PBS 0,1M + Triton 0,5%
 - Colocar o anticorpo direto sem lavagem.
15. **Incubação do anticorpo secundário** – 40min
BSA 1% + PBS 0,1M + Triton 0,5%
 - Anti- rabbit (vermelho- 594) → 1:300
16. Lavar em PBS 0,1M + Triton 0,5% - 1x (retirar o excesso de anticorpo)
17. Lavar em PBS 0,1M – 4x
18. **Bloqueio das ligações inespecíficas para o anticorpo secundário** – 1h
BSA 1% + PBS 0,1M + Triton 0,5%
 - Colocar o anticorpo direto sem lavagem.

19. **Incubação do segundo secundário** (no caso de marcação dupla ou tripla) – 1h
BSA 1% + PBS 0,1M + Triton 0,5%
 - Anti-mouse (verde-488) → 1:300)
20. **Revelação DAPI (marcação nuclear azul)**- 20min (acrescentar o DAPI nos últimos 20min)
 - **DAPI** → 1:1000 (solução mãe 3,3mg/mL) diluir em BSA 1% + PBS 0,1M + Triton 0,5%
21. Lavar em PBS 0,1M + Triton 0,5% - 1x (retirar o excesso de anticorpo)
22. Lavar em PBS 0,1M – 4x
23. Lavar rapidamente em água
24. Montagem da lâmina:
 - Colocar Flourmount - G (solução 3:1 em PBS 0,1M)
 - Amostra
 - Lamínula
 - Vedar com esmalte sem formol
 - Guardar no escuro à 4°C até análise no confocal

Protocolo Glicosaminoglicanos Sulfatados

Análise de Lâmina de PDA

- 1) Colocar as amostras em Acetona P.A. durante 4 dias à 4°C (macerar para a acetona entrar em contato com a amostra por completo);
- 2) Centrifugar a 6.000g por 10min e eliminar o sobrenadante;
- 3) Deixar evaporar o pellet (formará o pó cetônico) em temperatura ambiente (deixar o tubo aberto por +- 24h);
- 4) Incubar em Maxatase 3mg/mL em TRis/HCl 0.05 M pH 8.0 e NaCl 0.15M O/N à 56°C (irá degradar o a proteína);

-----EM BANHO DE GELO-----

- 5) Adicionar lentamente (gota à gota) TCA gelado no vórtex brando, até a concentração final de 10%;
- 6) Centrifugar à 6.000g por 15min à 4°C;
- 7) Colher o sobrenadante (contém os carboidratos) em um novo tubo e adicionar 3x o volume de Etanol Merck P.A. e deixar O/N à 20°C (desidrata o carbodrato e o mesmo por consequência desce);
- 8) Centrifugar à 6.000g por 15min à 4°C;
- 9) Descartar o sobrenadante e deixar secar em temperatura ambiente;
- 10) resuspende em 25 µL de água Milli-Q;
- 11) Aquecer a solução de agarose 0.6% em placa aquecedora (não deixar ferver) até que fique translúcida. Deixar esfriar até +- 50°C;
- 12) Colocar 300mL de agarose na cuba e 150 mL na bandeja para alinhar;
- 13) Colocar as lâminas de vidro em cima do gel da bandeja (gel já seco);
- 14) Adicionar mais 150mL de agarose em cima da bandeja com as lâminas de vidro;
- 15) Recortar a agarose da cuba e montá-la seguindo o seguinte esquema:
- 16) Fazer os spots com papel filtro 3M e aplicar as amostras (5 µL de cada amostra) e no primeiro spot colocar 5µL de mistura padrão de glicosaminoglicanos 1mg/mL;
- 17) Fechar os spots com os dedos empurrando o gel até não conseguir observar mais o pocinho; como as amostras são negativas, devido aos grupamentos sulfato, elas tem que correr do polo negativo para o positivo);
- 18) Correr à 100V e 300mA por 2h30min;
- 19) Quando terminar a corrida a lâmina de gel deve ser colocada em um fixador (Cetavlon 0,1%) por 2h no mínimo podendo ficar até O/N;

- 20) A cuba com benzina pode ser guardada, bem vedada, e utilizada umas 5 ou 6 vezes; deve-se lembrar de alternar a corrente entre corrida de géis ($A \rightarrow B$ e $B \rightarrow A$);
- 21) Após a fixação com Cetavlon, o gel deve ser seco com ventilação e calor; colocar sobre o gel uma tira de papel filtro do tamanho do gel com um das extremidades aproximadamente 2cm maior, prender esta aba sobre o gel com alfinete em um isopor para não descolar do gel e submeter a ventilação por $\pm 1h30min$;
- 22) Após a secagem, a lâmina com o gel deve ser corada com Azul de Toluidina 0.1% em 50% de Etanol e 1% de Ácido Acético (que tem afinidade pelos carboidratos- metacromasia) por 30min;
- 23) Depois de corada, a lâmina deve ser descorada, para retirar o excesso de corante por 15min (solução descorante: 0,1% de Ácido Acético em 50% de Etanol).
- 24) Fotografar o gel com câmera digital sempre utilizando os mesmos parâmetros (zoom e distância).

ANEXO III – ESTADIAMENTO DO JUNDIÁ *Rhamdia quelen* conforme Rodrigues-Galdino (2010).

TABELA 01. PERÍODOS E ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE *Rhamdia quelen* INCUBADOS A 21°C, 24°C, 27°C E 30°C.

| Período | Estádio | hpf 21°C | hpf 24°C | hpf 27°C | hpf 30°C | Descrição |
|-------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|--|
| Embrão | Zigoto | | | | | 1 célula – Citoplasma ativo se desloca em direção ao pólo animal e formação da membrana de fertilização |
| | Clivagem | | | | | 2 células – Clivagem meroblástica |
| | 3 | 1:00 | 1:00 | 1:00 | * | 4 células – matriz de 2 x 2 blastômeros |
| | 4 | 1:30 | 1:15 | 1:10 | 1:00 | 8 células – matriz de 2 x 4 blastômeros |
| | 5 | 2:00 | 1:30 | 1:20 | 1:10 | 16 células – matriz de 4 x 4 blastômeros |
| | 6 | 2:20 | 1:40 | 1:30 | 1:20 | 32 células – matriz de 4 x 8 blastômeros, células começam a compactar |
| | 7 | 2:40 | 1:50 | 1:45 | 1:30 | 64 células – 2 camadas de 32 blastômeros, formas YSL |
| Blástula | 8 | 3:00 | 2:00 | 2:00 | 1:45 | Blástula inicial - 128-256 blastômeros, formando uma semi-esfera |
| | 9 | 4:00 | 3:00 | 2:30 | 2:00 | Blástula média – 512 ou mais blastômeros |
| | 10 | 5:00 | 4:00 | 3:00 | 2:30 | Blástula tardia – Achatamento do blastodisco |
| | 11 | 5:30 | 5:00 | 4:45 | 4:00 | 30% Epibolia - Blastoderma altamente achatado com espessura uniforme; margem chega a 30% da distância entre os pólos animal e vegetal |
| Gástrula | 12 | 6:00 | 6:00 | 5h15 | 5:00 | 50% Epibolia – Margens do blastoderma atingem 50% da distância entre os pólos animal e vegetal; anel germinativo e, posteriormente, o escudo embrionário é visível |
| | 13 | 9:30 | 6:30 | 6:00 | 5:30 | 75% Epibolia – Blastoderma envolve 75-80% do embrião, lado dorsal é mais espesso |
| | 14 | 10:00 | 7:30 | 7:00 | 6:00 | Tampão de vitelo – Tampão de vitelo no pólo vegetal (blastoporo) |
| | 15 | 11:00 | 9:00 | 8:00 | 7:00 | Nêurula - Blastoderma cobre totalmente o tampão de vitelo, fechando o blastoporo; sulco neural visível; embrião toma-se elíptico |
| | 16 | 11:30 | 9:30 | 8:30 | 7:30 | Somitomitos 2-3 - Os primeiros pares de somitos e a vesícula óptica são visíveis |
| Segmentação | 17 | 15:00 | 11:15 | 9:00 | 8:00 | 6 somitos – Neurômeros cerebrais, vesículas ópticas, as narinas (órgão olfativo primordial), e notocorda visíveis |
| | 18 | 15:30 | 12:00 | 10:00 | 8:30 | 10 somitos - Vesícula de Kupfer e formação da placa ótica. Vesícula óptica mais evidente. |
| | 19 | 16:30 | 13:00 | 11:00 | 9:00 | 14 somitos – Mesencéfalo ligeiramente proeminente, lentes ópticas, início da formação da extensão de vitelo. |

| | | | | | |
|-----------|-------|-------|--------|-------|--|
| 20 | 17:30 | 14:00 | 11:30 | 10:30 | 18 somitos – Vesícula ótica, pelo menos 3 neuromeros no rombencéfalo, broto da cauda começa a projetar-se, primeiras contrações musculares |
| 21 | 20:30 | 15:30 | 15:00 | 12:30 | 25 somitos – somitos (miômeros) em "forma de V", flexões laterais do corpo, cauda e extensão de vitelo alongadas, otólitos na vesícula ótica, aorta dorsal visível, vesícula de Kupfer desapareceu |
| 22 | 26:00 | 17:00 | 16:00 | 14:30 | Farínghula inicial- ~ 30 miômeros, motilidade intensa (embrião em rotação no interior do cóion), desenvolvimento do intestino anterior (mas a boca e o ânus permanecem fechados), cavidade pericárdica visível, mesencéfalo dividido em dois hemisférios |
| 23 | 40:00 | 19:00 | 18:00 | 16:00 | Farínghula média – batimentos cardíacos (65-89 bpm), circulação fraca, intestino médio visível, extensão de vitelo desapareceu, nadadeira embrionária (dorsal continua com caudal e anal) |
| 24 | 41:00 | 21:00 | 19:00 | 18:00 | Farínghula tardia – Circulação aferente e eferente mais intensas (~ 80 bpm), ~ 40 miômeros, embriões dobrados (1/2 tronco) no interior do cóion; cóion se deforma com os movimentos do embrião, as aberturas correspondentes à boca e opérculo são visíveis, intestino posterior visível |
| 25 | 43:00 | 26:00 | 20:00 | 19:00 | Eclôso – motilidade baixa pouco antes da eclôso, ~ 100 bpm, sem pigmentação. |
| 26 | * | 36:00 | * | * | Larva inicial – Olhos pigmentados, a boca é uma abertura elíptica, primórdios dos barbilhões (3 pares), poro anal e opérculos abertos, bolsas faríngeas começam a desenvolver, neuromastos (estruturas da linha lateral) presentes no tronco e na região cefálica. |
| 27 | * | 66:00 | * | * | Larva média - Corpo torna-se pigmentado, barbilhões com pequenas e numerosas protuberâncias (botões gustativos), barbilhões maxilar maiores que os mentonianos, lábios inferior e superior tornam-se definidos |
| 28 | * | 90:00 | * | * | Larva tardia – Barbilhões bem desenvolvidos, botões gustativos nos barbilhões e lábios, maxilar projetado, narinas profundas com células ciliadas, saco vitelino muito reduzido, bexiga natatória inflada, início da alimentação exógena |
| Pós-larva | 29 | * | 7 dpf | * | Saco vitelino ausente, barbilhões e nadadeiras bem desenvolvidas. |
| Juvenil | 30 | * | 21 dpf | * | Aspecto semelhante ao adulto, poros do sistema de linha lateral |

NOTA: hpf = horas após a fertilização em; dpf = dias após a fertilização; YSL = camada sincicial de vitelo; * = não analisado.